

SÉRIE A - N° 247

N° D'ORDRE

271

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Anna BARKAÏ

LICENCIÉE ÈS-SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE

1^{re} THÈSE.— ACTION DES RAYONS DE COURTE LONGUEUR D'ONDE SUR LE
VIRUS VACCINAL ET SES GERMES ADVENTICES.

2^e THÈSE.— LES RÉACTIONS D'IMMUNITÉ DANS LA SÉRIE ANIMALE.

Soutenues le 20 JANV 1932 devant la Commission d'Examen

MM. PORTIER..... *Président.*

GUILLIERMOND. }
PRENANT } *Examineurs.*

PARIS

LES PRESSES MODERNES

IMPRIMERIE

45, RUE DE MAUBEUGE

1932

ACTION DES RAYONS
DE COURTE LONGUEUR D'ONDE
SUR LE VIRUS VACCINAL
ET SES GERMES ADVENTICES

Travail de l'INSTITUT SUPÉRIEUR DE VACCINE

Directeur : Dr L. CAMUS

SÉRIE A - N° 247

N° D'ORDRE

271

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Anna BARKAÏ

LICENCIÉE ÈS-SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE

1^{re} THÈSE.— ACTION DES RAYONS DE COURTE LONGUEUR D'ONDE SUR LE
VIRUS VACCINAL ET SES GERMES ADVENTICES.

2^e THÈSE.— LES RÉACTIONS D'IMMUNITÉ DANS LA SÉRIE ANIMALE.

Soutenues le 1932 devant la Commission d'Examen

MM. PORTIER..... *Président.*

GUILLIERMOND. }
PRENANT } *Examineurs.*

PARIS
LES PRESSES MODERNES

IMPRIMERIE
45, RUE DE MAUBEUGE

1932



Faculté des Sciences de l'Université de Paris

MM.

Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

Doyen honoraire M. MOLLIARD.

Professeurs honoraires {
H. LE CHATELIER.
H. LEBESGUE.
A. FERNBACH.
A. LEDUC.
Emile PICARD.
Rémy PERRIER.

Professeurs

E. GOURSAT	Analyse supérieure et algèbre supérieure
P. JANET	Electrotechnique générale.
F. WALLERANT	Minéralogie.
P. PAINLEVÉ	Mécanique analytique et mécanique céleste.
M. CAULLERY	Zoologie (Evolution des êtres organisés).
Emile BOREL	Calcul des probabilités et Physique mathématique.
H. ABRAHAM	Physique.
M. MOLLIARD	Physiologie végétale.
E. CARTAN	Géométrie supérieure.
Gabriel BERTRAND ...	Chimie biologique.
Jean PERRIN	Chimie physique.
L. LAPICQUE	Physiologie générale.
M ^{me} P. CURIE	Physique générale et radioactivité.
G. URBAIN	Chimie générale.
L. MARCHIS	Aviation.
E. VESSIOT	Théorie des fonctions et théorie des transformations.
A. COTTON	Physique générale.
J. DRACH	Application de l'analyse à la géométrie.
Charles FABRY	Physique.
R. LESPIEAU	Théories chimiques.
P. PORTIER	Physiologie comparée.
Charles PÉREZ	Zoologie.
E. BLAISE	Chimie organique.
P.-A. DANGEARD	Botanique.
Léon BERTRAND	Géologie structurale et géologie appliquée.
E. RABAUD	Biologie expérimentale.
G. JULIA	Calcul différentiel et calcul intégral.
Paul MONTEL	Mécanique rationnelle.
V. AUGER	Chimie appliquée.
P. WINTREBERT	Anatomie et histologie comparées.
O. DUBOSCQ	Biologie maritime.

Eugène BLOCH	Physique théorique et physique céleste.
N... ..	Etude des combustibles.
L. LUTAUD	Géographie physique et géologie dynamique.
Henri VILLAT	Mécanique des fluides et applications.
Ch. JACOB	Géologie.
P. PASCAL	Chimie minérale.
E. ESCLANGON	Astronomie.
H. BENARF	Mécanique expérimentale des fluides.
C. MAUGUIN	Minéralogie.
L. BLARINGHEM	Botanique.
A. GUILLIERMOND ..	Botanique (P.C.N.).
A. DENJOY	Mathématiques générales.
A. DUFOUR	Physique (P.C.N.).
H. BEGHIN	Mécanique physique et expérimentale.
E. PÉCHARD	Chimie (Enseignement P.C.N.).
A. GUILLET	Physique.
M. GUICHARD	Chimie minérale.
A. MICHEL-LÉVY	Pétrographie.
A. DEREIMS	Géologie.
H. MOUTON	Chimie physique.
L. DUNOYER	Optique appliquée.
M. JAVILLIER	Chimie biologique.
ROBERT - LÉVY	Zoologie.
A. DEBIERNE	Radioactivité.
E. DARMOIS	Physique.
G. BRUHAT	Physique.
F. PICARD	Zoologie (Evolution des êtres organisés).
L. JOLEAUD	Paléontologie.
M. FRÉCHET	Calcul des Probabilités et Physiques mathématiques.
M ^{me} RAMART-LUCAS ..	Chimie organique.
FOCH	Mécanique expérimentale des fluides.
PAUTHENIER	Physique (P.C.N.).
VILLEY	Mécanique physique et expérimentale.
DE BROGLIE	Théories physiques.
LABROUSTE	Physique du Globe.
FREUNDLER	Chimie (P.C.N.).
PRENANT	Zoologie.
P. JOB	Chimie générale.
CHRÉTIEN	Optique appliquée.
BOHN	Zoologie (P.C.N.).
N... ..	Chimie (P.C.N.).
COMBES	Sciences naturelles (P.C.N.).
GARNIER	Mécanique rationnelle.
PÉRÈS	Mécanique des Fluides.

Secrétaire..... A. PACAUD.

Secrétaire honoraire.. D. TOMBECK.

A mon Mari,

A mes Parents,

A mes Amis.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552803_0005

A Monsieur le Professeur PORTIER

Professeur à la Faculté des Sciences

Membre de l'Académie de Médecine

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la
présidence de cette thèse. En l'assurant
de mes sentiments dévoués.

A mon Maître, Monsieur le Docteur L. CAMUS

Membre de l'Académie de Médecine
Directeur de l'Institut Supérieur de Vaccine
Directeur général du Laboratoire de contrôle
des Médicaments antisypilitiques

Qui a bien voulu m'accueillir dans son
laboratoire avec tant de bienveillance et
me guider dans mes recherches de ses
précieux conseils.

Avec toute ma reconnaissance.

A mon Maître, Monsieur le Professeur H. BÉNARD

Professeur agrégé à la Faculté de Médecine

Qui n'a cessé de m'aider dans mon
travail.

En témoignage de ma profonde
gratitude et de respectueuse affection.

INTRODUCTION

Nous nous sommes proposée dans ce travail d'étudier le comportement du virus vaccinal et des germes, qui lui sont associés, à l'égard des radiations de courte longueur d'onde.

Soumettant une dilution vaccinale au rayonnement d'une lampe à vapeur de mercure, nous avons cherché tout d'abord à établir la courbe de virulence décroissante du vaccin ainsi irradié.

Nous avons ensuite comparé la résistance du vaccin à celle des germes adventices et tout particulièrement des différents staphylocoques qu'on trouve communément dans la pulpe vaccinale.

Une troisième série d'expériences a été consacrée à l'étude des phénomènes de photosensibilisation.

Nous avons utilisé surtout, comme substances sensibilisantes l'éosine et le rose Bengale et examiné leur influence sur le vaccin et les germes adventices soumis à l'action des courtes longueurs d'onde.

Enfin, dans une dernière partie de notre travail, nous avons cherché l'action de la lumière sur l'un des principaux anticorps de l'infection vaccinale et étudié les modifications du pouvoir virulicide sous l'influence de l'irradiation Ultraviolette.

CHAPITRE PREMIER

CONSIDÉRATIONS TECHNIQUES

Mesure de l'activité du virus vaccinal

Dans la plupart des expériences auxquelles nous avons été conduite, nous avons eu à suivre les modifications de l'activité d'un virus vaccinal.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour déterminer la virulence d'un vaccin antivariolique : celle de Groth, celle de Sobernheim, celle de Gins, celle de Calmette et Guérin et sa modification apportée par Camus.

Dans la méthode de Groth, après avoir rasé la région dorsale du lapin, on fait sur la moitié gauche quatre inoculations intradermiques de 0cc.1 de dilution vaccinale à des taux respectifs de 1/10, 1/100, 1/1.000 et 1/10.000.

Sur la moitié droite on répète la même opération avec un vaccin témoin.

L'activité est appréciée par l'importance de la réaction, par l'étendue de l'aréole inflammatoire, le degré d'infiltration, la présence d'éléments aberrants.

Cette méthode est d'une réalisation assez simple, mais il est difficile dans son interprétation de faire la part de ce qui revient au virus vaccinal et aux germes associés.

Dans la technique de Sobernheim on pratique sur la peau rasée d'un lapin 4 séries de 3 scarifications longitu-

dinales parallèles. Sur les 3 scarifications de chaque série on dépose 0,3cc. d'une dilution vaccinale mis goutte à goutte, qu'on étale soigneusement avec le fond d'un tube à essai. Les différentes séries de dilutions du vaccin sont respectivement de 1/1.000, de 1/2.000, de 1/4.000 et de 1/10.000.

On juge l'activité du vaccin, comme précédemment, par la grosseur des éléments, le degré de l'infiltration, l'étendue de l'aréole inflammatoire, l'importance des éléments aberrants.

On peut reprocher à cette méthode d'être un peu imprécise dans la répartition de la dilution vaccinale sur chaque scarification.

Dans la méthode de Gins on cherche qu'elle est la dilution limite du vaccin qui, inoculée à la cornée du cobaye, provoque encore l'apparition d'une keratite nette.

Les deux yeux de l'animal sont anesthésiés avec 1 gr. de cocaïne à 2 %. Au bout de 5' on fait à l'aide d'une aiguille finement acérée plusieurs scarifications parallèles.

On applique ensuite sur chaque cornée une dilution vaccinale connue. On examine le résultat au bout de 48 heures. Avec un vaccin d'une bonne activité une dilution à 1/100 donne une inflammation intense de la cornée rendant l'iris à peine visible, une dilution à 1/100 donne encore une kératite évidente.

Calmette et Guérin ont proposé une ingénieuse méthode qui utilise l'inoculation en nappe d'une dilution vaccinale sur la peau d'un lapin.

On choisit 4 lapins, dont on rase la région dorsale sur une zone de forme trapézoïdale dont la base répond à la ligne bi-iliaque. Sur deux lapins on étend 1cc. d'une dilution vaccinale dans l'eau distillée à 1/100 ou à 1/500, sur

les deux autres 1cc. d'une dilution vaccinale à 1/1000. La virulence spécifique est représentée par l'inverse de la dilution donnant 3 à 4 pustules par cent. carré.

Cette méthode nécessite, comme on voit, un nombre assez considérable d'animaux. D'autre part, elle ne prévoit pas d'inoculation avec un vaccin témoin, permettant d'éliminer les causes d'erreur tenant au plus ou moins de réceptivité de l'animal en expérience.

Ces objections n'existent pas dans la méthode de L. Camus, qui utilise un seul lapin pour six dilutions : trois dilutions d'un vaccin à étudier et les 3 dilutions correspondantes d'un vaccin témoin.

Dans cette dernière méthode l'inoculation du vaccin est en outre méthodiquement réglée. Ses résultats sont particulièrement fidèles et permettent aisément une appréciation quantitative.

C'est à cette technique que nous avons eu recours et nous rappellerons brièvement ici les différents temps qu'elle comporte :

Méthode de L. Camus.

On prépare tout d'abord des dilutions du vaccin au 1/100, au 1/1000 et au 1/10.000. Pour obtenir ces dilutions on aspire soigneusement le contenu d'un tube de vaccin dans une pipette spéciale, de calibre très étroit, d'une contenance de 1/10 de cc, avec une division en 1/20. On recueille ainsi 1/10 de cc. qu'on recoit dans un petit tube, renfermant au préalable 0cc.9 d'eau glycinée à 50 %. On mélange soigneusement.

On obtient ainsi une dilution vaccinale au 1/10 qui permettra de préparer la dilution au 1/100, avec laquelle

on fera la dilution au $1/1000$, qui donnera elle-même la dilution au $1/10.000^{\circ}$.

Ces dilutions étant obtenues, on choisit un lapin d'un poids supérieur à 2 k. et dont la peau soit aussi favorable que possible à l'inoculation. Tous les lapins ne sont pas équivalents à cet égard. Certains de ces animaux ont, en effet, sur la région dorsale des plages cutanées plus ou moins étendues au niveau desquelles le poil est dur et serré. Ces plages d'hypertrychose, une fois rasées, sont le siège d'une repousse très rapide qui masque l'évolution du vaccin. Fort heureusement il est facile de reconnaître ces zones en soufflant légèrement sur la peau du lapin, de façon à écarter les poils. Si elles sont trop nombreuses ou trop étendues, l'animal ne doit pas être utilisé.

Cette première épreuve une fois effectuée, l'animal choisi est immobilisé sur un appareil de contention et soigneusement rasé, en évitant d'excorier la peau. L'opération est du reste grandement facilitée en faisant une insufflation sous-cutanée d'acide carbonique, qui distend le tégument et l'éloigne des irrégularités du squelette osseux.

Cet acide carbonique se résorbe avec une très grande rapidité et ne gêne en rien l'évolution de la vaccine.

L'animal une fois rasé, lavé et essuyé, on trace au crayon dermatographique, sur la peau ainsi mise à nu, de part et d'autre de la ligne médiane trois zones carrées antérieure, moyenne et postérieure, ayant chacune 5 cm de côté.

C'est sur les plages ainsi délimitées qu'on inoculera les dilutions vaccinales : sur la plage antérieure la dilution à $1/100$; sur la plage moyenne la dilution à $1/1000$; et sur la plage postérieure la dilution à $1/10.000$.

Les 3 compartiments de gauche sont réservés au vaccin à éprouver. Ceux de droite recevront les dilutions correspondantes d'un vaccin témoin.

Pour procéder à chacune de ces inoculations on dépose sur l'espace réservé 0,3 cc de la dilution vaccinale. Cette dilution est répartie tout d'abord en fines gouttelettes, qu'on étale ensuite aussi uniformément que possible.

Pour faciliter l'insertion du vaccin, on gratte légèrement la région enduite avec l'extrémité franchement sectionnée d'une pipette Pasteur qu'on manie, comme un crayon avec lequel on voudrait obtenir une teinte plate. Ces hâchures faites successivement dans différentes directions déterminent une rougeur de la peau sans lésions profondes, mais qui, mieux que le simple feu du rasoir, sont propices à la pénétration des germes vaccinaux.

Les inoculations faites, l'animal est détaché et isolé dans une cage à l'abri du froid.

Au bout de 4 jours l'éruption vaccinale apparaît et atteint son maximum vers le 6^e jour. C'est à ce moment qu'il convient de lire les résultats.

Un vaccin de bonne activité donne sur la plage au 1/100^e une éruption confluyente avec épaissement de la peau ; sur la plage au 1/1000^e une éruption confluyente ; sur la plage au 1/10.000^e des éléments séparés au nombre de 1 à 2 par cm².

La densité des éléments sur la plage au 1/10.000^e rapprochée de l'infiltration plus ou moins considérable des plages au 1/1000^e et au 1/100^e permettent une appréciation facile de l'activité du vaccin.

Pour des vaccins très affaiblis des dilutions au 1/1000^e

voire même au $1/100^{\circ}$ ou au $1/10^{\circ}$, peuvent ne plus donner que des éléments séparés.

Ces résultats sont corroborés par ceux que donne l'inoculation des muqueuses nasale et labiale, faite chez le même animal en même temps que l'inoculation cutanée. On se sert pour ces inoculations muqueuses d'une dilution vaccinale à $1/100$ qu'on insère par piqûre à l'aide d'une lancette ou d'un vaccinostyle en trois points du rebord nasal et de la lèvre supérieure du côté correspondant à l'inoculation cutanée ; avec un vaccin de bonne activité on voit se développer une pustule nette au niveau de chacun des points inoculés. Ces pustules apparaissent d'une façon un peu plus précoce que l'éruption cutanée.

Telle est la technique que nous avons utilisée toutes les fois que nous avons voulu apprécier les modifications dans l'activité d'un virus vaccinal.

Nous n'insisterons pas sur la façon de procéder à la numération des germes adventices. Nous avons eu recours à ce point de vue à la technique classique d'étalement sur boîtes de Pétri et dénombrement des colonies après un séjour de 24 à 48 heures dans l'étuve à 37° .

CHAPITRE II

ACTION ABIOTIQUE DES RAYONS ULTRA-VIOLETS VIS-A-VIS LE VIRUS VACCINAL ET LES GERMES ADVENTICES

Parmi les nombreuses propriétés des radiations U.V. l'action destructive à l'égard des cellules vivantes ou *action abiotique* est une des plus anciennement connue.

Dès 1877, Downes et Blunt (1) montraient que la lumière était douée de propriétés bactéricides et ils rapportaient cette action bactéricide non pas à l'élévation de température produite par l'irradiation, mais à l'action directe des rayons chimiques, c'est-à-dire des rayons de courtes longueurs d'ondes.

Ces faits ont été rapidement confirmés par Duclaux (2), par Arloing (3) et Roux (4), qui étudièrent surtout l'action de l'irradiation solaire.

Geisler (5), Buckner (6), d'Arsonval et Charrin (7),

- (1) Downes et Blunt, 169, 61. Proc. Royal Soc., 1877-79.
- (2) Duclaux, 15. J. de Physique, 1923.
- (3) Arloing, 171, 4, 5. Semaine Méd., 1885, Ac. Sc., 1885.
- (4) Roux, 171, 174. Ann. Pasteur, 1887.
- (5) Geisler, 171, 4 Arch. méd. exper., nov. 1891. Centralbl. Bakt., 1892.
- (6) Buckner, 171, 3, 4 (cit. Mallet, 83-4), 229 (cit. Albela).
- (7) D'Arsonval et Charrin, 171. Arch. Phys. normale et path. 1894.

Finsen (1) et Bié (2) établirent de leur côté l'activité bactéricide puissante produite par les radiations U.V. émanant de la lampe à arc.

Depuis lors des travaux nombreux ont été faits sur l'action nocive des radiations de courtes longueurs d'ondes sur différents microbes, ayant en vue quelques applications pratiques, telles que la stérilisation de l'eau ou la préparation des vaccins microbiens.

En ce qui concerne le virus vaccinal, son comportement à l'égard des rayons ultra-violets est de connaissance plus récente.

Finsen et Dreher (3) ont trouvé que le virus vaccinal était plus résistant que les microbes vis-à-vis des rayons U.V.

Larsen considère également que le virus vaccinal est peu sensible aux rayons de courtes longueurs d'ondes, d'où possibilité, comme l'ont proposé Friedberg et Mironesco (4), d'utiliser l'irradiation pour purifier le vaccin, c'est-à-dire le débarrasser de ses germes adventices. C'est ainsi, qu'ajoutant des microbes à du vaccin antivariolique, ces derniers auteurs obtiennent en 20' une disparition presque complète des microbes, en 30' une stérilisation complète alors que le vaccin manifestait encore son action sur la cornée du lapin.

Ces expériences n'ont pas été confirmées par Mayer-

(1) Finsen, 38, 171, 9, 4, 88, 96, 207, 11, 21, 77, 81, 323, 34, 521, 23, 30, Sem. Méd. 1894 et 97 ; la Photothérapie, 1899, Paris, Naud ; Bedeutung chemischer Strahlen, Leipzig 1899 ; Fins. Mitt, 1, III, IV, V, VI, VIII.

(2) Bié 171, 72, 74, 181, Fins. Mitt. 1900, I, VII, 1905, IX.

(3) Finsen et Dreher, 177. Fins. Mitt., 1903, III.

(4) Friedberg et Mironesco, 177, D.M.W., 1914, n° 24.

hofer (1) qui obtient un affaiblissement marqué de la lymphé vaccinale sous l'action des rayons ultra-violets.

Carnot, Tessier, Camus et H. Bénard (2) ont même montré que le virus vaccinal était extrêmement sensible aux courtes longueurs d'ondes. Linden et Swartz (3) insistent également sur la fragilité du vaccin antivariolique à l'égard des U.V. Une irradiation de 1 minute à 30 cm. d'un brûleur de quartz suffit à stériliser le vaccin.

Ce sont ces expériences que nous avons reprises en essayant de préciser quelques-uns des facteurs susceptibles d'intervenir sur l'action abiotique des U.V. vis-à-vis du virus vaccinal.

Action des U. V. sur le vaccin

Dans une première série d'expériences, nous avons cherché à établir la courbe d'atténuation du virus vaccinal en fonction de la durée d'irradiation.

Nous avons utilisé comme source des U.V. une lampe à vapeur de mercure (lampe de 300 w. à l'usage médical, construite par la Verrerie Scientifique).

Deux cc. d'une dilution vaccinale à 1/100 ou à 1/1000 étaient placés dans une cuve d'un diamètre tel que l'épaisseur du liquide ne dépassait pas 3 m/m. Cette cuve était disposée à 1 mètre au-dessous du brûleur.

Durant l'irradiation on prenait la précaution d'agiter la cuve par de légers mouvements de circumduction de façon à bien renouveler la couche superficielle du liquide.

(1) Mayerhofer, 177, 179, 222, Zt. f. Kinder., 1916.

(2) Carnot P., Tessier P., Camus L., Bénard H. Action des rayons U.V. sur l'éruption variolique. Comptes rendus Soc. Biol. 1926, p. 1564.

(3) H. Linden et K. Schwartz. Zentralbl. f. Bact. (abt. 1) 122. 237, 239 Svt. 7, 31.

Les irradiations ont été prolongées durant 15' à 30 minutes.

Au cours de cette irradiation on prélevait de temps à autre un échantillon de la dilution vaccinale pour l'inoculer au lapin et suivre ainsi l'affaiblissement progressif de la virulence.

Nos expériences ont porté sur quarante lapins.

Les quelques tableaux que nous donnons ici permettent de suivre la marche du phénomène.

Expérience n° 1.

Vaccin XXX, dilué 100 fois dans l'eau glycinée à 50 %.

Distance du brûleur : 1 m.

Prélèvement pratiqué au bout de 1',5 ; 3' ; 6' et 15' d'irradiation.

Inoculation d'épreuve pratiquée sur un lapin noir ♂ 2 kg 400 (0 cc 3 sur plage cutanée de 5 × 5).

Tableau n° 1 .

	(témoin)				
Temps d'irradiation	0'	1'5	3'	6'	15'
Nombre de pustules correspondant à cha- que prélèvement	150	34	0	0	0

Si l'on prend pour mesure de la virulence le nombre de pustules correspondant à l'inoculation de 0 cc 3, on voit que dans cette expérience au bout de 1'5 d'exposition l'activité du vaccin est passée de 150 (chiffre de départ) à 34 (soit un affaiblissement d'environ 80 %). Au bout de 3' le virus vaccinal s'est montré complètement stérilisé.

Expérience 2.

Vaccin XXX : dilut. à 1/100.

Distance du brûleur : 1 m.

Prélèvement au bout de 1'5, 3', 6' et 15'.

Lapin gris ♂ 2 k° 050.

Tableau n° 2
(témoin)

Temps d'irradiation	0'	1'5	3'	6'	15'
Nombre de pustules	150	7	13	12	0

Dans cette expérience l'activité du virus vaccinal subit comme précédemment une diminution extrêmement rapide, mais la stérilisation n'est pas encore complète au bout de 6 minutes.

Expérience 3.

Vaccin XXX : dilut. à 1/1000.

Distance du brûleur : 1 m.

Irradiation poursuivie pendant 2', 4', 8', 16', 32'.

Lapin roux ♀ 2 kg 250.

Tableau n° 3
(témoin)

Temps d'irradiation	0'	2'	4'	8'	16'	32'
Nombre de pustules	150	4	1	0	0	0

Au bout de 2' d'irradiation la virulence du vaccin est tombée à quelques centièmes de sa valeur initiale. La stérilisation complète se produit entre la 4^e et la 8^e minute.

Expérience 4.

Vaccin XXX : dilut. à 1/100.

Distance du brûleur : 1 m.

Irradiations poursuivies pendant 2' 4' 6' 18' et 32'.
Lapin gris ♂ 2 k° 175.

Tableau n° 4

(témoin)

Temps d'irradiation	0'	2'	4'	6'	18'	32'
Nombre de pustules	150	130	17	1	0	0

Dans cette expérience une courte irradiation de 2' laisse subsister presque intégralement la virulence du virus. Celle-ci ne baisse d'une façon considérable que dans les deux minutes suivantes. Au bout de 6' la stérilisation est à peu près complète.

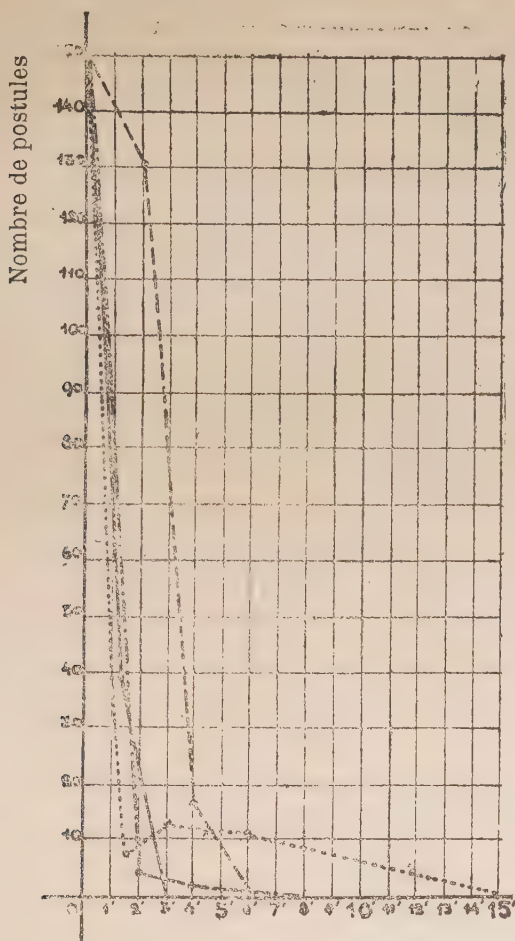
Comme on le voit, les rayons ultra-violet, dans les conditions où nous les avons utilisés, se sont montrés extrêmement nocifs pour le virus vaccinal.

Au bout de 2' d'irradiation en effet, l'activité du vaccin est diminuée de $\frac{4}{5}$ ou d'avantage encore de sa valeur initiale.

Dans quelques expériences telle que l'expérience n° 4, le vaccin a paru montrer une résistance un peu plus longue. Mais il faut compter avec le défaut d'homogénéité des dilutions vaccinales qui peut permettre à quelques particules, très riches en vaccin, d'échapper d'une façon plus ou moins durable à l'action des rayons. Du reste, cette résistance est toute transitoire puisque, dans les deux minutes qui suivent, le vaccin perd presque complètement sa virulence.

La stérilisation progressive du vaccin sous l'influence des rayons U.V. peut être schématisée par les courbes ci-jointes, qui sont la traduction graphique des quatre expériences que nous venons de rapporter. Dans ces graphiques

on a porté en abscisse les durées de l'irradiation et en ordonnée le nombre de pustules exprimant, conformément aux conventions précédentes, la virulence restante du vaccin.



Durée de l'irradiation

Courbe de stérilisation du vaccin en fonction du temps d'irradiation par les U.V. à 1 m. du brûleur.

Légende : en abscisse : les durées de l'irradiation.
en ordonnée : le nombre de pustules exprimant la virulence restante du vaccin.

— Expérience n° 1
..... » n° 2
- . - . » n° 3
- - - - » n° 4

Afin de mieux apprécier dans ses détails la stérilisation progressive du vaccin par les rayons, il nous a paru intéressant de refaire de nouvelles expériences en utilisant une intensité beaucoup plus faible de l'irradiation.

Il était difficile d'augmenter suffisamment la distance séparant la dilution vaccinale du brûleur de la lampe. Nous avons préféré recourir à la filtration des rayons par un verre de Wood.

On sait que le verre de Wood, qui renferme une certaine proportion d'oxyde de nickel, ne laisse passer qu'une bande assez étroite du spectre comprise entre 4000 et 3000 Å. et apporte sur cette région privilégiée un affaiblissement considérable de la lumière transmise. Le phénomène de la stérilisation était ainsi très ralenti, la disparition complète de toute virulence demandant 40 minutes à 1 heure au lieu de 2 à 4 minutes, comme précédemment.

Afin d'éliminer toute lumière parasite non filtrée, la cuve renfermant la dilution vaccinale était placée à l'intérieur d'une cuve un peu plus grande, soigneusement garnie de papier noir.

C'est sur l'orifice supérieur qu'on appliquait le verre de Wood qui se trouvait ainsi placé à 4 cm. de la dilution vaccinale. Cet ensemble était maintenu, suivant les cas, à 40 cm ou à 1 mètre du brûleur de la lampe.

Les résultats que nous avons obtenus avec cette nouvelle technique sont consignés dans les tableaux suivants :

Expérience 1.

Vaccin XXX : dilut. à 1/1000.

Distance du brûleur : 40 cm (verre de Wood).

Prélèvements au bout de 5' 10' 15' 20' et 40 minutes.

Lapin gris ♀ 2 k° 420.

Tableau n° 5

(témoin)

Temps d'irradiation	0'	5'	10'	15'	20'	40'
Nombre de pustules	70	28	14	4	7	1

Cette expérience montre bien le ralentissement apporté par la filtration à travers le verre de Wood. Tandis que à feu nu le vaccin était stérilisé en quelques minutes seulement, il a fallu ici environ 40' pour aboutir au même résultat. Le vaccin faiblit d'abord rapidement dans les 15 premières minutes d'irradiation et ensuite beaucoup plus lentement.

Expérience 2

Vaccin XXX : dilution à 1/10.000.

Distance du brûleur : 40 cm (verre de Wood).

Prélèvements au bout de 2'5 5' 10' 20' et 40'.

Lapin blanc ♀ 2 k°.

Tableau n° 6

(témoin)

Temps d'irradiation	0'	2'5	5'	10'	20'	40'
Nombre de pustules	30	31	17	10	15	1

Le vaccin montre une certaine résistance à 2'5 d'irradiation. Son activité est presque nulle après 40' d'exposition.

Expérience 3.

Vaccin XXX : dilution à 1/1000.

Distance du brûleur : 40 cm (verre de Wood).

Prélèvements au bout de 2'5 5' 10' 20' 40'.

Lapin gris ♂ 2 k° 500.

Tableau n° 7

(témoin)

Temps d'irradiation	0'	2'5	5'	10'	20'	40'
Nombre de pustules	44	30	22	5	3	5

Le vaccin s'affaiblit d'abord lentement, puis plus rapidement, puis à nouveau lentement.

Expérience 4.

Vaccin XXX : dilution à 1/1000.

Distance du brûleur : 40 cm (verre de Wood).

Prélèvements au bout de 2,5 5' 10' 20' et 40 minutes.

Lapin gris ♂ 2 k° 370.

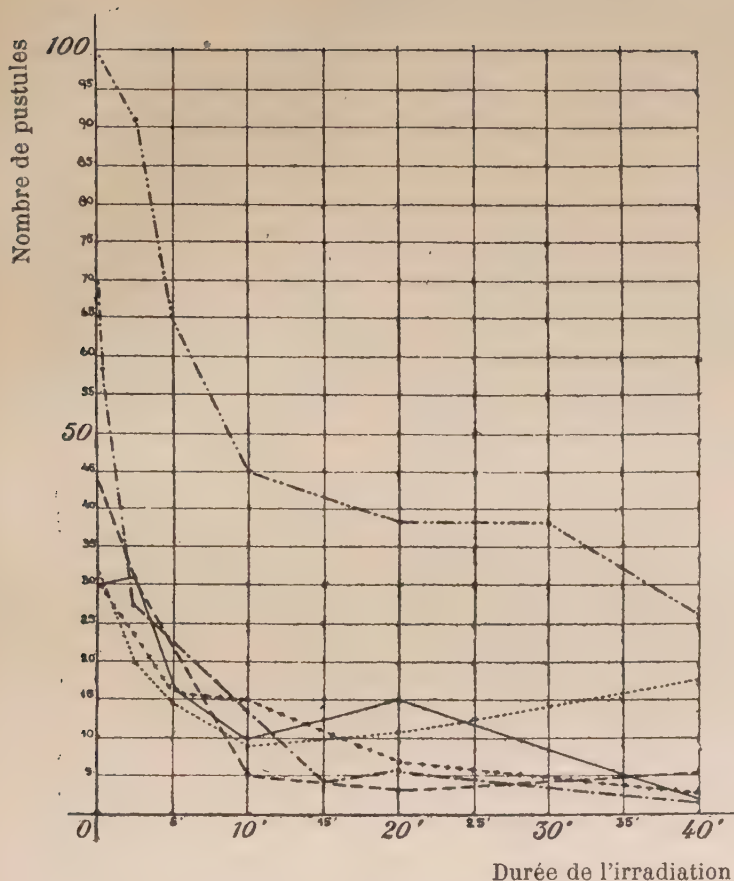
Tableau n° 8

(témoin)

Temps d'irradiation	0'	2'5	5'	10'	20'	40'
Nombre de pustules	31	26	16	15	7	3

L'affaiblissement du vaccin se produit assez régulièrement. Nous avons pratiqué d'autres expériences toujours avec la lumière de Wood, qui nous ont donné des résultats assez comparables.

Toutes ces expériences sont schématisées dans les courbes ci-jointes qui, par leur ensemble, montrent l'allure générale de la photostérilisation du vaccin.



Courbes de stérilisation du vaccin en fonction du temps d'irradiation par les rayons U.V. à travers le verre de Wood. En ordonnée nombre de pustules fournies par l'inoculation de 0 cm³ de dilution vaccinale, en abscisse durée d'irradiation.

Légende : en abscisse : durée de l'irradiation.
 en ordonnée : nombre de pustules exprimant la virulence restante du vaccin.

— . — . — . — Expérience n° 1
 — — — — — » n° 2
 — — — — — » n° 3
 + + + + + » n° 4
 [.] » n° 5
 . . — . . — . . » n° 6

Comme on voit, la virulence baisse d'abord rapidement dans les 10 à 15 premières minutes de l'irradiation, puis l'affaiblissement du vaccin se ralentit et quelques germes particulièrement résistants ne disparaissent qu'au delà de 40' d'irradiation.

Seuil d'irradiation. — Sur quelques-unes de nos courbes la baisse de virulence ne se manifeste d'une façon nette qu'avec un certain retard, 2 ou 3 minutes après le début de l'irradiation. Cette particularité laisse supposer qu'il existe un seuil d'irradiation au-delà duquel seulement commence l'action abiotique des rayons.

Afin de mettre en évidence la réalité de ce seuil, qui n'apparaît pas sur toutes nos courbes, nous avons repris un certain nombre d'expériences en introduisant quelques précautions techniques, susceptibles de donner plus de régularité dans nos résultats.

Une des causes de ces irrégularités est, comme nous l'avons dit, le défaut d'homogénéité parfaite des dilutions vaccinales. Ce défaut d'homogénéité se fait sentir aussi bien lors de l'irradiation que lors de l'inoculation d'épreuve sur le tégument du lapin. Aussi avons-nous pris soin de centrifuger assez longuement nos dilutions vaccinales.

Une centrifugation de 20' à 3.000 tours (diamètre = 13 cm.) n'affaiblit que d'une façon négligeable la dilution vaccinale (le vaccin étant finement broyé), tout en lui conférant une homogénéité à peu près parfaite.

Les expériences que nous rapportons ci-dessous ont été faites en utilisant des dilutions vaccinales ainsi centrifugées.

Expérience 1.

Vaccin XXX : dilution à 1/1000.
 Distance du brûleur : 40 cm (verre de Wood).
 Prélèvements au bout de 2' 5' 10' 20' et 40'.
 Lapin noir ♂ 2 k° 650.

Tableau n° 9

	(témoins)					
Temps d'irradiation	0'	2'	5'	10'	20'	40'
Nombre de pustules	140	139	138	70	53	32

Expérience 2.

Vaccin XXX : dilution à 1/1000.
 Distance du brûleur : 40 cm (verre de Wood).
 Prélèvements au bout de 2' 5' 10' 20' et 40 minutes.
 Lapin gris ♀ 2 k° 225.

Tableau n° 10

	(témoins)					
Temps d'irradiation	0'	2'	5'	10'	20'	40'
Nombre de pustules	150	150	150	55	80	52

Expériences 3 et 4.

Vaccin XXXI : dilution à 1/10.000.
 Distance du brûleur : 40 cm (verre de Wood).
 Prélèvements au bout de 5' 10' 20' et 40 minutes.
 a) Lapin gris ♂ 2 k° 700.
 b) Lapin roux ♂ 2 k° 220.

Tableau n° 11

	(témoin)				
Temps d'irradiation	0'	5'	10'	20'	40'
Nombre de pustules	80	78	77	19	12
Lapin (a)					
Nombre de pustules	22	20	19	10	1
Lapin (b)					

Expérience 5.

Vaccin XXXI : dilution à 1/20.000.

Distance du brûleur : 40 cm (verre de Wood).

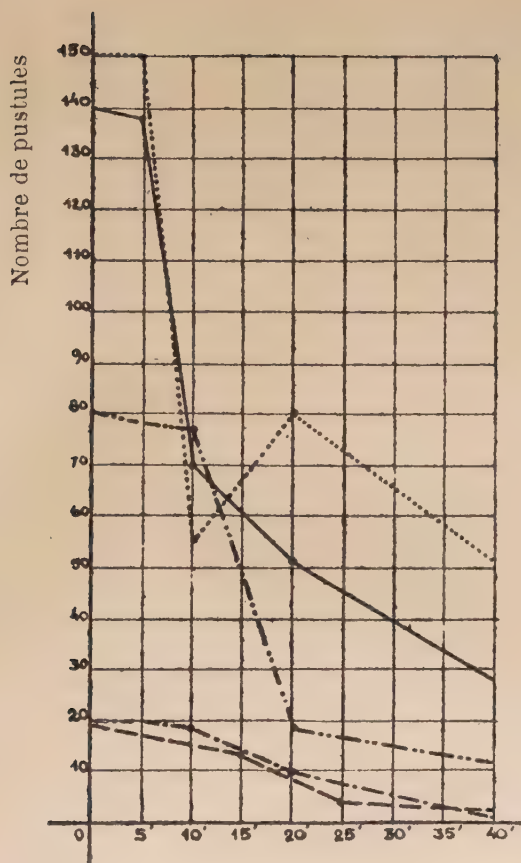
Prélèvements au bout de 15' 25' 45' et 65 minutes.

Lapin gris ♀ 2 k° 250.

Tableau n° 12

	(témoin)				
Temps d'irradiation	0'	15'	25'	45'	65'
Nombre de pustules	19	15	5	1	0

Les résultats de ces cinq expériences sont représentées graphiquement sur le tableau ci-joint.



Durée de l'irradiation

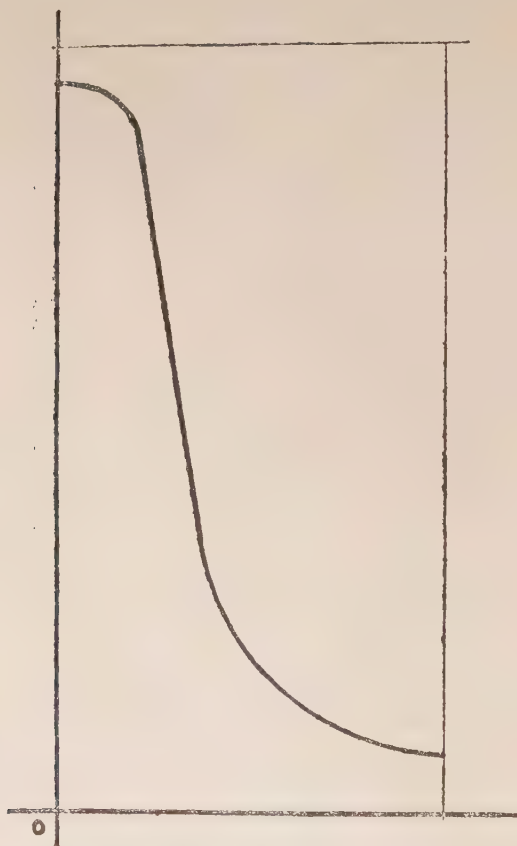
Courbes de stérilisation du vaccin en fonction du temps d'irradiation par les rayons U.V. filtré à travers le verre de Wood.

Légende : en abscisse : durée de l'irradiation.
 en ordonnée : nombre de pustules exprimant la virulence restante du vaccin.

—————	Expérience n° 1
.....	» n° 2
-.-.-.-.-	» n° 3
— . — . — . — . — . — .	» n° 4
— — — — —	» n° 5

Sur les 5 courbes de ce graphique on voit nettement l'existence du seuil d'irradiation qui est de 5' pour la première et la seconde, de 10' pour la 3^e et la 4^e et qui devait avoir une durée analogue pour la 5^e, pour laquelle le premier prélèvement n'a été fait qu'au bout de 15 minutes.

Dans son ensemble la courbe représentative de la stérilisation du vaccin par les rayons ultra-violetts présente donc 3 portions représentées dans le schéma ci-joint.



Courbe schématique de stérilisation du vaccin par les rayons U.V.

Une première portion, horizontale, correspondant au seuil d'irradiation, c'est-à-dire à la durée maxima de résistance des germes les plus sensibles du vaccin, vient ensuite une descente brusque traduisant l'affaiblissement rapide du vaccin, c'est-à-dire la destruction progressive des germes de résistance moyenne, les plus nombreux. Enfin, dans une 3^e portion, la courbe reprend une direction à peu près horizontale, un petit nombre de germes particulièrement résistants ne subissant que lentement l'action des rayons et retardant d'autant la stérilisation complète du vaccin.

Action abiotique des Rayons ultra-violets

vis-à-vis les Microbes

Comme nous l'avons dit plus haut, de nombreux auteurs ont étudié sur différents microbes l'action bactéricide des rayons de courte longueur d'onde.

Nos expériences portent sur les germes les plus fréquemment associés au vaccin antivariolique : staphylocoques blanc, doré, et citreus.

Nous nous sommes servie de culture sur gélose âgées de 24 heures, que nous mettions en suspension dans la liqueur de Locke additionnée de son volume de glycérine. Afin d'éviter des tâtonnements inutiles, l'émulsion était d'abord ajustée par voie néphélométrique à un taux convenable de densité optique. Sa richesse précise en germes était ultérieurement donnée par dénombrement des colonies après ensemencement sur boîtes de Pétri.

L'intensité de l'irradiation et sa durée ont varié dans d'assez larges limites dans nos différentes expériences.

Nous nous sommes servie tour à tour d'une lampe courante de la Verrerie Scientifique de 300 w. et d'une lampe moins puissante obligeamment prêtée par les établissements Radiguet.

Durant l'expérience l'émulsion microbienne était fréquemment agitée suivant la technique habituelle. Des prélèvements successifs de 0cc,1 étaient effectués en cours d'irradiation pour la numération des germes sur boîtes de Pétri, le dénombrement de colonies étant fait au bout de 48 heures.

Nous avons fait l'étude séparée d'abord et comparative ensuite, des staphylocoques doré, blanc et citreus isolés du vaccin.

Expérience 1.

Staphylocoque doré :

Emulsion de départ : 35.000 par 0cc,1.

Lampe Radiguet :

Distance du brûleur : 1 m. 65.

— Prélèvements au bout de 5', 10', 20' et 40 minutes.

Tableau n° 13

	(témoin)				
Temps d'irradiation	0'	5'	10'	20'	40'
Nombre de colonies	25.000	20.000	2.000	100	37

Après 5 minutes d'action des rayons U.V. le nombre de germes a diminué environ de moitié. Il y a cependant quelques germes qui ont résisté à une irradiation, poursuivie pendant 40 minutes.

Expérience 2.

Staphylocoque doré :

Emulsion de départ : 140 colonies par 0cc,1.

Lampe Verrerie Scientifique :

Distance du brûleur : 42 cm.

Prélèvements au bout de 3' 6' 9' 18 minutes.

Tableau n° 14

(témoin)

Temps d'irradiation	0'	3'	6'	9'	18'
Nombre de colonies	140	15	3	0	boîte infectée

Les germes résistent très peu et se trouvent détruits entre 6 et 9 minutes d'irradiation.

Expérience 3.

Staphylocoque doré :

Emulsion de départ : 40.000 germes par 0 cc 1
(série 1 et série 2).

Lampe Verrerie Scientifique :

Distance du brûleur : 42 cm.

Prélèvements faits après 1' 3' 6' 10' 15' et 20 minutes.

Tableau n° 15

(témoin)

Temps d'irradiation	0	1	3	6	10	15	20'
Nombre de colonies	40.000	30.000	2	0	1	0	0
(série 1)							
Nombre de colonies	40.000	28.000	5.625	350	2	0	0
(série 2)							

Dans les deux séries de boîtes les microbes ont été détruits pratiquement après 10 minutes.

Expérience 4.

Staphylocoque doré :

Emulsion de départ : 2.000.

Lampe Verrerie Scientifique :

Distance du brûleur : 42 cm.

Prélèvements faits au bout de 2' 5' 10' 15' et 20'.

Tableau n° 16

	(témoins)					
Temps d'irradiation	0'	2'	5'	10'	15'	20'
Nombre de colonies	2.000	115	3	0	0	0

L'émulsion microbienne est stérilisée entre 5' et 15 minutes d'irradiation.

Expérience 5.

Staphylocoque blanc :

Emulsion de départ : (série 1) 45.000 colonies.
(série 2) 40.000 colonies

Lampe Radiguet :

Distance du brûleur : 1 m. 50.

Prélèvements faits après 5' 10' 20' et 40 minutes.

Tableau n° 17

	(témoin)				
Temps d'irradiation	0'	5'	10'	20'	40'
Nombre de colonies	45.000	30	26	7	1
(série 1)					
Nombre de colonies	40.000	9.180	2.460	infectée	0
(série 2)					

La stérilisation de la série 2 est un peu en retard sur la stérilisation de la série 1 mais dans les deux séries les germes sont pratiquement détruits entre la 20^e et la 40^e minute.

Expérience 6.

Staphylocoque citreus.

Emulsion de départ : (série 1) 373 colonies
(série 2) 453 colonies

Lampe Radiguet :

Distance du brûleur : 1 m. 65.

Prélèvements faits après 5' 10' 20' et 40 minutes.

Tableau n° 18

Temps d'irradiation	0'	5'	10'	20'	40'
Nombre de colonies (série 1)	373	294	338	376	270
Nombre de colonies (série 2)	453	439	320	340	300

Cette expérience comparée à celle concernant les staphylocoques blanc ou doré, soumis à la même irradiation, montre que le citreus paraît beaucoup moins sensible aux rayons ultra-violets que ses congénères blancs et dorés. Après 40' d'irradiation à une distance de 1 m. 65 du brûleur il est à peine affaibli tandis que les staphylocoques blancs et dorés sont complètement détruits.

Expérience 7.

Staphylocoque citreus.

Emulsion de départ : 743 colonies par Occ,1.

Lampe Radiguet :

Distance du brûleur : 87 cm.

Prélèvements faits au bout de 5' 10' 20' et 40 minutes.

Tableau n° 19

	(témoin)				
Temps d'irradiation	0'	5'	10'	20'	40'
Nombre de colonies	743	419	665	790	30

Après 20' d'irradiation on n'aperçoit aucune action abiotique des U.V. 40 minutes d'irradiation ont laissé 4 % de microbes.

Expérience 8.

Staphylocoque citreus.

Emulsion de départ : 1.400 colonies.

Lampe Verrerie Scientifique :

Distance du brûleur : 12 cm.

Prélèvements faits au bout de 1' 3' 5' 8' et 12 minutes.

Tableau n° 20

	(témoin)					
Temps d'irradiation	0'	1'	3'	5'	8'	12'
Nombre de colonies	1.400	1.200	600	300	20	0

Irradiés à 12 cm. du brûleur les microbes sont détruits entre 8 et 12 minutes d'irradiation.

Les expériences rapportées ci-dessus mettent en évidence la grande résistance qu'offre le staphylocoque citreus aux rayons ultra-violets lorsqu'on le compare au staphylocoque blanc et au staphylocoque doré.

La différence apparaît plus nettement encore lorsqu'on

irradie simultanément sous la même lampe et à une même distance du brûleur les 3 souches du staphylocoque.

Expérience 9.

Staph. citreus : émuls. de dép. 3.040 col. par 0cc,1
 — blanc : » » 4.600 » » —
 — doré : » » 2.800 » » —

Lampe Verrerie Scientifique :

Distance du brûleur : 1 mètre.

Prélèv. de staph. citreus au bout de 6' et 12 minutes.

Prélèv. de staph. blanc et doré au bout de 0,5, 1 et 2'.

Tableau n° 21

(témoin)

Temps d'irradiation	0'	0,5	1'	2'	6'	12'
citreus	3.040	—	—	—	74	137
blanc	4.600	12	0	0	—	—
doré	2.800	1.800	1	0		

Les staphylocoques blancs et dorés sont déjà détruits au bout de 1' à 2', le staphylocoque doré étant peut-être un peu plus résistant que le staphylocoque blanc ; l'émulsion de citreus n'est pas encore complètement stérilisée au bout de 12 minutes.

Expérience 10.

Staph. citreus : émuls. de départ 35.000
 — blanc : » » 37.000
 — doré : » » 35.000

Lampe Verrerie Scientifique :

distance du brûleur : 1 m.

Prélèvements faits :

pour staph. citreus : après 2' 4' 7' et 12'

pour staph. blanc : après 4'

pour staph. doré : après 1' 4' et 7 minutes.

Tableau n° 22

Temps (témoin)					
d'irradiation	0'	2'	4'	7'	12'
citreus	35.000	9.375	4.900	1.000	12
blanc	37.000	—	0	—	—
doré	35.000	—	0	0	—

Ici encore le citreus a résisté beaucoup plus longtemps que les staphylocoques blanc et doré.

Expérience 11.

Staph. citreus : émuls. de départ : 520

— doré : » » 10.000

Lampe Radiguet :

Distance du brûleur : 87 cm.

Prélèvements faits au bout de 5' 10' 20' et 40 minutes.

Tableau n° 23

	(témoin)				
Temps d'irradiation	0'	5'	10'	20'	40'
citreus	520	650	493	403	15
doré	10.000	30	6	1	1

Le citreus n'est pas complètement détruit au bout de 40 minutes d'irradiation ; il ne montre pratiquement aucun affaiblissement au bout de 20 minutes, alors que l'émulsion du staphylocoque doré est très touchée en 3 minutes et pratiquement stérilisée vers la 20^e minute.

Lorsqu'on analyse la marche de la stérilisation progressive d'une émulsion de microbes extraits du vaccin soumise à l'action des rayons U.V., on retrouve, comme pour le vaccin, une première phase de résistance correspondant à un seuil d'irradiation puis une baisse rapide dans le nombre des germes vivants, enfin une troisième phase, au cours de laquelle certains éléments microbiens particulièrement résistants ne disparaissent qu'assez lentement.

Nous nous sommes demandée s'il n'était pas possible de sélectionner une souche de microbes activorésistants, en repiquant les germes qui avaient échappés à l'action nocive des rayons U.V. et qui s'étaient ainsi montrés plus résistants que les autres.

Voici quelques expériences que nous avons faites dans ce sens.

Expérience 1.

On ensemence sur boîte de Pétri une émulsion de citreus soumise au préalable durant 10 minutes au rayonnement de notre forte lampe à vapeur de mercure, le brûleur se trouvant à 1 m. de l'émulsion.

Au bout de 24 heures, un certain nombre de staphylocoques se sont développés. Avec ces colonies qui correspondent à des germes ayant résisté à l'irradiation on prépare une nouvelle émulsion (C^{1°}) qu'on compare à une émulsion (C[°]) faite avec des colonies provenant de staphylocoque citreus n'ayant jamais subi aucune irradiation.

En vue de cette comparaison les deux émulsions (C^{1°} et C[°]) sont soumises simultanément à l'action abiotique d'un même rayonnement.

Lampe Verrerie Scientifique.

Distance du brûleur : 1 m.

Richesse de l'émulsion : (C^{1°}) 1.952 ; (C°) 9.000.

Tableau n° 24

	(témoin) \				
Temps d'irradiation	0'	10'	12'	15'	20'
(C ^{1°})	1.952	4	0	0	0
(C°)	9.000	154	15	3	0

L'émulsion témoin (C°) est stérilisée entre la 12^e et 20^e minute d'irradiation, alors que l'émulsion (C^{1°}) l'est déjà pratiquement au bout de 10 minutes.

Cette différence ne peut pas être expliquée par l'inégale teneur en germes du départ.

Loin de mettre en évidence une actino-résistance des germes issus d'éléments ayant échappés eux-mêmes à l'irradiation, cette expérience semblerait indiquer plutôt un résultat inverse.

Les colonies provenant de l'ensemencement de l'émulsion C^{1°}, soumises elles-mêmes à 10 minutes d'irradiation, sont repiquées sur gélose. Avec la culture de 24 heures on fait une nouvelle émulsion C^{1°},^{1°} qu'on compare à C^{1°} et à C° en ce qui concerne la résistance aux U.V.

C° émulsion de départ : 14.750

C^{1°} émulsion de départ : 3.650

C^{1°},^{1°} émulsion de départ : 20.000

Lampe Verrerie Scientifique.

Distance du brûleur : 1 m.

Prélèvements faits au bout de 5' 10' et 15 minutes.

Tableau n° 25

(témoin)

Temps d'irradiation	0'	5'	10'	15'
C°	14.750	6.000	478	13
C ^{1°}	3.650	700	27	2
C ^{1°} , ^{1°}	20.000	90	0	0

On voit que contrairement à l'hypothèse d'une actino-résistance en rapport avec des irradiations ancestrales, l'émulsion C^{1°}, ^{1°} (irradiée pendant 2 générations) est plus sensible que l'émulsion C^{1°} (irradiée pendant une génération), plus sensible elle-même que C° (sans irradiation ancestrale).

Loin de créer des souches actinorésistantes, nous avons obtenu au contraire des souches actinosensibles.

Expérience 2.

Mêmes notations que dans l'expérience précédente :

a) C° : Staphylocoques citreus issus de germes n'ayant jamais subi d'irradiation. Emuls. de dép. 9.000 germ.

C^{1°} : Straphyl. citreus issus de germes ayant subi une irradiation de 10'. Emuls. de dép. 1.952 germ.

Irradiation d'épreuve pour la comparaison des deux émulsions.

Lampe Verrerie Scientifique.

Distance du brûleur : 1 m.

Prélèvements faits au bout de 10' 12' 15' et 20 minutes.

Tableau n° 26

(témoin)

Temps d'irradiation	0'	10'	12'	15'	20'
C°	9.000	154	15	3	0
C ^{1°}	1.952	4	0	0	0

Ici encore le citreus provenant de germes préalable-
ment irradiés paraît moins résistant aux U.V. que le ci-
treus témoin (C0).

b) On prépare avec les colonies résultant de l'ensemencement de C^{1°} après 10' d'irradiation, une nouvelle émulsion C^{1°, 1°} irradiée ancestralement sur deux générations. Cette nouvelle émulsion est comparée à C° et C^{1°}.

C° émulsion de départ : 4.800

C^{1°} émulsion de départ : 6.400

C^{1°, 1°} émulsion de départ : 7.600

Lampe Verrerie Scientifique.

Distance du brûleur : 1 m.

Prélèvements faits après 10' 13' et 16 minutes.

Tableau n° 27

	(témoin)			
Temps d'irradiation	0	10'	13'	16'
C°	4.800	51	2	1
C ^{1°}	6.400	2	0	0
C ^{1°, 1°}	7.600	1	0	0

La photosensibilisation est à peu près la même pour C^{1°} et C^{1°, 1°} et nettement inférieure à celle de C°.

Expérience 3.

C° émulsion de départ : 8.625

C^{1°} émulsion de départ : 8.000

C^{1°, 1°} émulsion de départ : 13.400

B° (staph. blancs issus de germes n'ayant subi aucune irradiation) émulsion de départ : 1.100.

Irradiation d'épreuve.

Lampe Verrerie Scientifique.

Distance du brûleur : 1 m.

Prélèvements faits :

C° au bout de 10' et 15 minutes

C^{1°} au bout de 3' et 5 minutes

C^{1°, 1°} au bout de 3' et 5 minutes

B° au bout de 1'5 et 3 minutes.

Tableau n° 29

Temps d'irradiation	(témoin)					
	0'	1'5	3'	5'	10'	15'
C°	8.625	—	—	—	11	6
C ^{1°}	8.000	—	—	380	0	
C ^{1°, 1°}	13.400	—	340	80		
B°	1.100	17	0			

La photosensibilisation va en décroissant de C° à C^{1°} et à C^{1°, 1°}. Cette dernière émulsion reste moins sensible que B°.

Les résultats que nous venons de rapporter sont donc concordants pour établir qu'un citreus irradié, mais ayant survécu à cette irradiation, engendre des germes qui, loin d'être protégés contre l'action de la lumière, se montrent au contraire plus sensibles à l'action abiotique des courtes longueurs d'ondes.

Au cours de nos expériences nous avons remarqué que les colonies de citreus provenant de germes irradiés présentaient une coloration nettement moins marquée que les colonies témoins. Au bout de 2 générations, chacune irradiée, les colonies peuvent devenir complètement incolores.

Cette diminution du pouvoir chromogène prouve que

l'action de l'irradiation est susceptible d'entraîner des modifications biologiques transmissibles héréditairement. L'augmentation de la sensibilité aux rayons est un autre phénomène, lui aussi transmis héréditairement.

Photorésistance comparative du Vaccin et des Microbes

Il était intéressant de rechercher si le vaccin présentait à l'égard des U.V. une résistance différente de celle des microbes adventices et si l'irradiation par les courtes longueurs d'ondes pouvait constituer un procédé de purification bactériologique du vaccin.

Dans ce but nous avons suivi par des prélèvements successifs au cours d'une même irradiation d'une part, l'affaiblissement du vaccin et d'autre part, son appauvrissement en germes associés.

Nous nous sommes adressée à différentes souches vaccinales assez chargées en microbes. Nous nous sommes servie dans cette série d'expériences uniquement d'une lampe forte (300 W. Verrerie Scientifique).

Expérience 1.

Vaccin L n° 4 à 1/200.

Distance du brûleur : 1 m.

Prélèvements faits au bout de 0' 1'5 et 3 minutes.

Inoculation d'épreuve sur un lapin blanc ♂ 2 k° 175.

Tableau n° 30

	(témoin)		
Temps d'irradiation	0'	1'5	3'
Vaccin	175 pust.	34 pust.	0
Microbes	167 col.	7 col.	0

Les germes adventices sont détruits presque en même temps que le virus vaccinal.

Expérience 2.

Vaccin de lapin à 1/100.

Distance du brûleur : 1 m.

Prélèvements faits au bout de 1'5 3' 6' et 15 minutes.

Lapin gris ♂ 2 k° 650.

Tableau n° 31

(témoin)

Temps d'irradiation	0'	1'5	3'	6'	15'
Pustules	180	7	13	12	0
Microbes	444	33	0	1	0

Dans cette expérience les germes adventices sont pratiquement tués après 6 minutes d'irradiation. Le vaccin est considérablement affaibli au bout de 1'5, et détruit entre la 6° et la 15° minute.

Expérience 3.

Vaccin n° XXX à 1/100.

Distance du brûleur : 1 m.

Prélèvements faits au bout de 2' 4' 8' 16' 32 minutes.

Lapin roux et blanc 3 kg.

Tableau n° 32

(témoin)

Temps d'irradiation	0°	2'	4'	8'	16'	32'
Pustules	170	130	17	1	0	0
Microbes	470	69	4	3	0	0

Le vaccin et les microbes suivent dans leur destruc-

tion une marche parallèle. La stérilisation est complète entre la 8^e et la 16^e minute.

Expérience 4.

Vaccin XXX à 1/1000.

Distance du brûleur : 1 m.

Prélèvements faits au bout de 2' 4' et 8'.

Lapin gris ♂ 2 kg. 700.

Tableau n° 33

	(témoin)			
Temps d'irradiation	0'	2'	4'	8'
Pustules	150	5	2	0
Microbes	25	5	1	0

Ici encore les microbes et le vaccin sont tués simultanément.

Dans une autre série d'expériences nous avons filtré les rayons U.V. à travers le verre de Wood.

Expérience 5.

Vaccin L. n° 4 à 1/100.

Distance du brûleur : 50 cm.

Prélèvements faits au bout de 5' 10' 30' et 60'.

Lapin blanc ♀ 2 kg 150.

Tableau n° 34

	(témoin)				
Temps d'irradiation	0'	5'	10'	30'	60'
Pustules	100	100	100	56	50
Microbes	205	225	228	217	80

Après 60 minutes d'irradiation le vaccin et les germes

adventices se trouvent affaiblis l'un et l'autre à peu près de moitié.

Expérience 6.

Vaccin L. n° 4 à 1/400.

Distance du brûleur : 50 cm. (verre de Wood).

Prélèvements faits au bout de 0' 15' 30' et 1 heure.

Lapin gris ♀ 2 kg 400.

Tableau n° 35

	(témoin)			
Temps d'irradiation	0'	15'	30'	1 h.
Pustules	82	64	53	55
Microbes	125	42	3	0

Dans cette expérience les microbes ont disparu au bout d'une heure alors que le vaccin conserve encore plus de la moitié de sa virulence.

En résumé, si l'on met à part l'expérience 6, on peut dire que microbes adventices et vaccin subissent sous l'influence des rayons ultra-violets un affaiblissement parallèle.

L'irradiation par les rayons de courte longueur d'onde ne saurait donc, sans modification de la technique, constituer un procédé de purification du vaccin. On sait qu'il existe plusieurs procédés de purification du vaccin qui, par définition, détruisent les microbes tout en laissant persister une virulence notable de la lymphe vaccinale.

Mais la plupart de ces procédés agissent en milieu anaérobie, c'est-à-dire soit dans le vide, soit en présence d'un réducteur.

Dans nos expériences les rayons U.V. ont été tou-

jours appliqués en présence d'oxygène et même en présence de l'ozone qui prend naissance sous l'influence des rayons.

Nous nous proposons de reprendre nos recherches dans le vide et en présence d'un réducteur.

Peut-être, dans ces conditions particulières, la résistance relative du vaccin et des germes adventices se trouvera-t-elle modifiée.

CHAPITRE III

PHOTOSENSIBILISATION DU VACCIN ET DES GERMES ADVENTICES

La sensibilisation vis-à-vis de la lumière est un phénomène actuellement bien connu.

On peut, en effet, par l'adjonction de certaines substances, renforcer l'action des radiations lumineuses et les rendre opérantes à des doses où elles seraient restées sans effet.

La découverte de ces substances sensibilisatrices remonte à Vogel (1). En 1873, cet auteur avait remarqué, en effet, que les sels d'argent des plaques photographiques additionnés de certaines substances fluorescentes, telles que l'éosine, devenaient impressionnables à des radiations de longueurs d'onde relativement grandes et d'ordinaire inactives.

Cette découverte fut bientôt transposée dans le domaine de la biologie.

Une expérience involontairement pratiquée sur des chevaux en Allemagne est particulièrement suggestive à cet égard. Afin de distinguer l'orge réservé à la fabrication de la bière de l'orge destiné à l'alimentation des chevaux,

(1) Vogel. Berichte Deutsch Chem. Ges. 1873.

le gouvernement allemand avait décidé de colorer ce dernier ou escourgeon par de l'éosine. Des recherches préalables de Titze avaient permis de s'assurer de l'inocuité de l'éosine. Or, malgré cette donnée, un assez grand nombre de chevaux présentèrent des accidents graves et l'enquête méthodique permit de se rendre compte que c'étaient les animaux exposés le plus longtemps à la lumière qui payaient le plus lourd tribut. Ceux, au contraire, qui n'avaient guère quitté l'étable, ne présentaient aucun signe morbide.

On ne peut trouver là une démonstration plus évidente du rôle de sensibilisation joué par l'éosine, substance par elle-même inoffensive, à l'égard des rayons lumineux.

Depuis lors, l'étude de la photo-sensibilisation a fait l'objet d'un très grand nombre de recherches, tant au point de vue physique qu'au point de vue biologique et médical.

La liste des substances sensibilisatrices s'est progressivement accrue, comprenant un nombre considérable de substances colorantes et en particulier des substances fluorescentes.

Le mécanisme de leur action a donné lieu à plusieurs hypothèses séduisantes mais dont aucune ne s'est encore imposée d'une façon définitive.

★★

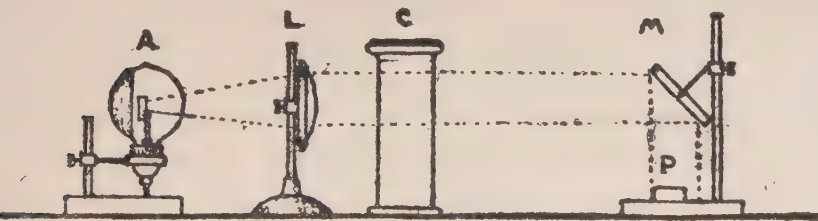
Nos recherches ont porté sur la photosensibilisation du virus vaccinal et des germes adventices. Le schéma d'une expérience est le suivant :

L'action combinée de la lumière et d'un sensibilisa-

teur exerce une action nocive supérieure à la somme des actions élémentaires de la lumière et du sensibilisateur pris isolément. Une expérience de sensibilisation vis-à-vis du vaccin antivariolique comporte donc au minimum deux témoins : 1° action du sensibilisateur sur le vaccin ; 2° action de l'irradiation sur le vaccin sans sensibilisateur.

TECHNIQUE. — Etant donné la brutalité de l'action abiotique des rayons ultra-violet, nous avons, pour donner au phénomène une durée suffisante, utilisé le rayonnement, non pas d'une lampe à vapeur de mercure, mais d'une lampe à incandescence, d'assez forte puissance (250 bougies), telle que celles qui sont couramment utilisées dans les lanternes à projections. Une telle lampe est pauvre en rayons ultra-violet, mais par contre riche en rayons lumineux et caloriques. Pour éliminer l'intervention du rayonnement thermique, nous avons interposé une cuve d'eau sur le trajet des rayons.

Le dispositif expérimental est représenté par la fig. 5.



Dispositif utilisé pour l'irradiation des dilutions vaccinales.

- A : Lampe à incandescence de 250 bougies.
- L : Lentille plane-convexe.
- C : Cuve d'eau
- M : Miroir plan.
- P : Dilution vaccinale.

Les rayons formés par la lampe A sont concentrés par une lentille L qui envoie le faisceau lumineux sur un miroir M incliné à 45° qui réfléchit les rayons en P.

Sur le trajet du faisceau lumineux, après la lentille, se trouve interposée une cuve C, à faces parallèles, remplie d'eau distillée.

En P, on place deux petits godets renfermant sur une épaisseur de 3 m/m, l'un une dilution de vaccin, l'autre la même dilution additionnée de sensibilisateur.

Par la manœuvre de la lentille L on règle le faisceau lumineux en P, de telle façon que les deux godets, placés côte à côte, soient également irradiés. Quelques mouvements d'agitation assuraient à la fois l'égale répartition de la lumière et le renouvellement des couches superficielles du liquide. Parallèlement, un échantillon de la dilution vaccinale additionnée du sensibilisateur était placé à titre de témoin à l'obscurité.

Nous avons surtout utilisé comme sensibilisateur, le rose bengale et l'éosine. Les irradiations ont été poursuivies durant 5' 10' 15' 20 minutes, jusqu'à 1 h. 50. Au terme de chaque expérience, la virulence des différents liquides vaccinaux a été éprouvée, suivant la technique usuelle, en inoculant à un même lapin sur une plage cutanée de 25 à 30 cm² 0cc,3 de chacun des prélèvements.

Photosensibilisation du vaccin

L'expérience suivante montre la réalité d'un phénomène de sensibilisation obtenu vis-à-vis du virus vaccinal à l'aide de l'éosine.

On prépare une dilution de vaccin (vaccin 30, de l'Institut Supérieur de Vaccine) à 1/100 dans l'eau glycinée

à 50 % avec le liquide de Locke. Un cent. cube de cette dilution est additionné de 1 cc. d'eau glycinée. Une autre portion est étendue de deux fois son volume d'éosine à 1/500.000 dans l'eau glycinée.

On obtient ainsi, d'une part, une dilution du vaccin à 1/200, d'autre part cette même dilution de vaccin à 1/200, renfermant de l'éosine à 1/1.000.000.

Une petite quantité de chacune de ces dilutions vaccinales est placée respectivement dans l'un et l'autre de deux godets, sur une épaisseur de 3 mm. D'autre part, un échantillon de chacune de ces mêmes dilutions est conservé à l'obscurité.

L'irradiation est poursuivie pendant 10', 20' et 30 minutes.

Le tableau ci-contre donne le nombre de pustules obtenues sur un lapin, 5 jours après l'inoculation de 0 cc,3 de chaque prélèvement.

Expérience 1.

Tableau n° 36

Temps de l'irradiation	Vaccin plus sensibilisateur V.S.	Vaccin sans sensibilisateur V.O.
0'	100 pustules	100 pustules
10'	24	90
30'	0	90
Témoins conservés		
30' à l'obscurité	100	100

Comme on voit le nombre de pustules de V.S.I. (vaccin + sensibilisateur irradiés) est très inférieur à celui de V.O.S.

D'autre part nous constatons que la virulence des témoins, conservés à l'obscurité, est exprimée par un nombre égal de pustules (100 et 100). Ce qui nous fait admettre que dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placée, l'action toxique propre du sensibilisateur est restée négligeable.

Dans son ensemble l'expérience que nous venons de relater prouve donc l'existence de photosensibilisation, réalisée par de l'éosine à la concentration infime de 1/1.000.000.

Cette expérience satisfait, en effet, aux conditions que nous avons posées plus haut, à savoir : que la somme des actions nocives de la lumière et du sensibilisateur pris isolément doit être inférieure à ces deux actions s'exerçant simultanément.

Nous avons essayé de donner une expression numérique à ces différences qu'introduit la présence du sensibilisateur dans la fragilité du vaccin vis-à-vis de la lumière. Pour ce faire, nous pouvons prendre comme « pouvoir toxique » du sensibilisateur (Ts), la proportion des pustules supprimées en dehors de toute irradiation du fait de la simple introduction du sensibilisateur.

$$Ts = \frac{N_{voo} - N_{vso}}{N_{voo}}$$

N_{voo} étant le nombre de pustules correspondant au vaccin sans éosine, non irradié, et N_{vso} le nombre de pustules correspondant au vaccin + sensibilisateur non irradié.

Dans l'expérience précédente ce pouvoir toxique du sensibilisateur était = 0. Dans d'autres de nos expé-

riences il se chiffrait par 10 à 20 %, mais ne dépassait qu'exceptionnellement ces chiffres.

L'action *nocive des rayons* Tirr peut être représentée par la proportion de pustules supprimées par le simple fait de l'irradiation en dehors de l'adjonction de sensibilisateur.

$$\text{Tirr} = \frac{\text{Nvoo} - \text{Nvoi}}{\text{Nvoo}}$$

Nvoo nombre de pustules correspondant au vaccin sans sensibilisateur et sans irradiation, Nvos nombre de pustules correspondant au vaccin sans sensibilisateur mais irradié pendant un temps déterminé.

$$\text{Dans l'expérience précitée } \text{Tirr} = \frac{100 - 30}{100} = 10 \%$$

Enfin, l'action *conjuguée* de la lumière et du sensibilisateur Ts + irr peut-être représentée par la proportion de pustules supprimées du fait de l'irradiation en présence du sensibilisateur.

$$\text{Ts + irr} = \frac{\text{Nvoo} - \text{Nvsi}}{\text{Nvoo}}$$

$$\text{égale } \frac{100 - 0}{100} = 100 \%$$

En confrontant ces différents chiffres on voit que l'éosine à 1/1.000.000 s'est montrée douée d'un pouvoir toxique propre complètement nul, mais a fait passer le pouvoir abiotique de l'irradiation de 10 % (sans éosine) à 100 % (avec éosine).

Le pouvoir *sensibilisant* (Ps) peut être exprimé par la différence.

$$Ps = Ts + irr - (Tirr + Ts)$$

égale 100 % — (10 % + 0 %) = 90 %.

Bien entendu, ces chiffres ne doivent pas être pris dans un sens de précision mathématique rigoureux. Ils fournissent seulement un ordre de grandeur du phénomène en même temps qu'une manière commode de le représenter.

Les expériences qui suivent sont assez comparables à celle sur laquelle nous venons de nous étendre.

Expérience 2.

Même technique que précédemment.

Vaccin XXX à 1/200.

Eosine à 1/160.000.

Temps d'irradiation 10' et 30 minutes.

Lapin blanc ♀ 2 kg 200.

Tableau n° 37

Temps de l'irradiation	Vaccin plus sensibilisateur V.S.	Vaccin sans sensibilisateur V.O.
0'	90 pustules	100 pustules
10'	7	100
30'	0	90
Témoins conservés		
30' à l'obscurité	90	100

Nous constatons un pouvoir antiseptique de l'éosine. En effet, les deux liquides conservés dans l'obscurité nous ont donné un nombre de pustules légèrement différent et

moindre pour le liquide vaccinal ayant séjourné 30' dans l'éosine. Son pouvoir toxique sera donc :

$$Ts = \frac{N_{voo} - N_{vso}}{N_{voo}} = \frac{100 - 90}{100} = 10 \%$$

Les rayons ayant également exercé une faible action abiotique sur le vaccin, leur action nocive est en effet

$$Tirr = \frac{N_{voo} - N_{voi}}{N_{voo}} = \frac{100 - 90}{100} = 10 \%$$

Le résultat final de l'expérience aboutissant à une stérilisation complète du vaccin, nous pouvons dire que :

$$Ps = Ts + irr - (Ts + Tirr) \\ \text{égale } 100 \% - (10 + 10) = 80 \%$$

La sensibilisation est représentée ici par le chiffre 80 % voisin de celui obtenu dans l'expérience 1.

Expérience 3.

Vaccin XXX : à 1/200

Eosine à 1/1.000.000

Temps d'irradiation 10' et 30 minutes.

Lapin gris ♂ 2 kg 150.

Tableau n° 38

Temps de l'irradiation	Vaccin plus sensibilisateur V.S.	Vaccin sans sensibilisateur V.O.
0'	100 pustules	125 pustules
10'	12	100
30'	0	100
Témoins conservés		
30' à l'obscurité	100	125

Nous remarquons ici encore l'existence d'une action toxique de l'éosine :

$$Ts = \frac{N_{voo} - N_{vso}}{N_{voo}} = 20 \%$$

L'action nocive de la lumière est également faible :

$$Tirr = \frac{N_{voo} - N_{voi}}{N_{voo}} = \frac{125 - 100}{125} = 20 \%$$

L'irradiation en présence de l'éosine amène une stérilisation complète, soit 100 %, d'où

$$Ps = Ts + irr - (Ts + Tirr)$$

égale 100 % — (20 % + 20 %) = 60 %.

Dans les trois expériences que nous venons de rapporter et qui toutes trois concernent l'éosine, le phénomène de photosensibilisation est donc indiscutable et peut être évalué d'après les conventions précédentes à 90 %, 80 % et 60 %.

La photosensibilisation a été retrouvée dans toutes nos expériences quoique parfois avec une intensité moindre.

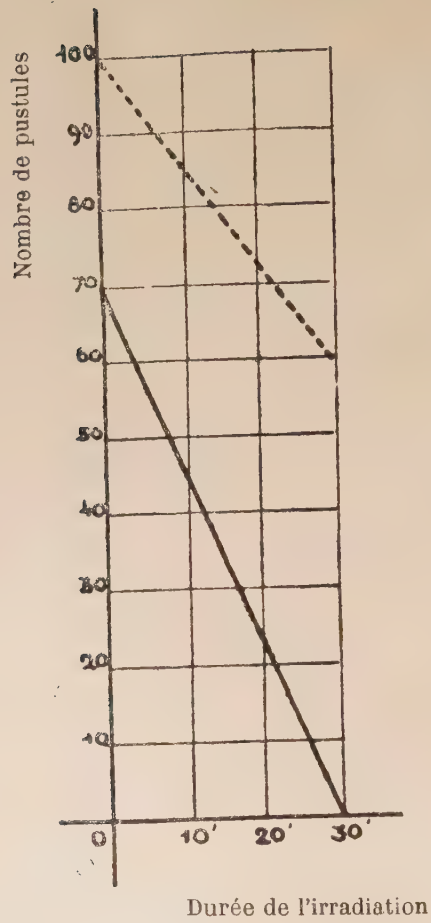
Les graphiques ci-joints représentent des moyennes obtenues sur 13 lapins. En ordonnées, figure le nombre de pustules fournies par inoculation d'épreuve, c'est-à-dire un chiffre proportionnel à la virulence du vaccin. En abscisses on a placé la durée de l'irradiation, soit 30 minutes.

La ligne supérieure correspond au vaccin irradié sans sensibilisateur, la ligne inférieure au même vaccin irradié en présence d'éosine. On a pris pour cette dernière comme ordonnée à l'origine la virulence restante du vac-

cin après un contact avec l'éosine durant 30 minutes à l'obscurité.

Comme on voit, les lignes représentatives supérieure et inférieure ne restent pas parallèles, mais vont en divergeant. Au bout de 30 minutes d'irradiation, le vaccin sensibilisé est complètement stérilisé, alors que le vaccin non sensibilisé garde une virulence de 60 %.

L'écart entre les deux virulences est alors nettement supérieur à celui qui résulte de la simple action antiseptique du sensibilisateur. Il y a donc eu phénomène de photosensibilisation.



Légende : en abscisse, la durée de l'irradiation.
en ordonnée : le nombre de pustules exprimant la virulence restante du vaccin.

- — — — — stérilisation du vaccin sans sensibilisateur.
————— stérilisation du vaccin en présence du sensibilisateur.

Une autre façon de mettre en évidence la photosensibilisation est de mesurer le temps minimum nécessaire pour obtenir la stérilisation complète du vaccin avec ou sans sensibilisateur. Le principe d'expérimentation reste le même que précédemment. Nous prolongeons simplement le temps d'irradiation du V.O. (vaccin sans sensibilisateur).

Expérience 1.

Vaccin XXX : à 1/200

Eosine à 1/1.000.000

Temps d'irradiation : 5' 10' 40' et 60 minutes.

Lapin gris ♀ 2 kg 400.

Tableau n° 39

Temps de l'irradiation	Vaccin plus sensibilisateur V.S.	Vaccin sans sensibilisateur V.O.
0'	100 pustules	100 pustules
5'	7	
10'	0	
40'		90
60'		90
Témoins conservés		
60' à l'obscurité	100	100

Le V.S. a été stérilisé après 10 minutes d'irradiation tandis que le vaccin non sensibilisé a résisté pendant 60 minutes qu'a duré l'expérience, en ne subissant qu'un très léger affaiblissement. Sa virulence restante est en effet, encore de 90 %. La différence avec la virulence de départ est d'ordre des erreurs d'expérimentation.

Expérience 2.

Vaccin XXX : à 1/200.

Eosine à 1/1.000.000

Irradiation de V.O. poursuivie jusqu'à 1 h. 50.

Lapin noir ♂ 2 kg 300.

Tableau n° 40

Temps de l'irradiation	Vaccin plus sensibilisateur V.S.	Vaccin sans sensibilisateur V.O.
0'	22 pustules	45 pustules
3'	3	
5'	1	
80'		43
1 h. 50		10
Témoins conservés		
1 h. 50 à l'obscurité	22	45

L'irradiation poursuivie pendant 1 h. 50 n'abolit pas complètement l'activité du vaccin naturel (V.O.), alors que le vaccin sensibilisé (V.S.) est pratiquement stérilisé déjà au bout de 10 minutes. Après 1 h. 50, le vaccin sans éosine (V.O.) possède encore plus de 20 % de sa virulence initiale.

Notons que dans cette expérience comme dans les précédentes, toutes les inoculations d'épreuve ont été faites simultanément sur le lapin, soit 1 h. 50 environ après la mise en route. L'éosine a donc agit non seulement en tant que sensibilisateur durant l'irradiation mais également en tant qu'antiseptique, une fois celle-ci terminée. Or, ce pouvoir antiseptique pour une durée de près de 2 heures ne s'est pas montré négligeable, puisqu'il a fait tomber par lui-même la virulence de 45 à 22.

Mais en tenant compte de cette cause d'erreur, l'action photosensibilisatrice de l'éosine reste évidente.

Expérience 3.

Vaccin XXX : à 1/200

Eosine à 1/1.000.000

Temps d'irradiation : 3' 5' 60'' et 1 h. 50.

Lapin gris ♀ 2 kg 050.

Tableau n° 41

Temps de l'irradiation	Vaccin plus sensibilisateur V.S.	Vaccin sans sensibilisateur V.O.
0'	30 pustules	100 pustules
3'	6	
5'	2	
60'		90
1 h. 50		3
Témoins conservés		
1 h. 50 à l'obscurité	30	100

Dans cette expérience le vaccin naturel est presque complètement stérilisé après 1 h. 50 d'irradiation.

Le même résultat est obtenu pour le vaccin sensibilisé au bout de 5 minutes seulement d'irradiation. Pour les mêmes raisons que celles invoquées précédemment, l'action antiseptique propre de l'éosine ne saurait faire méconnaître le phénomène de sensibilisation.

Sensibilisation à l'égard des germes adventices

Au cours de nos expériences sur la sensibilisation du virus vaccinal, nous avons pu vérifier qu'un phénomène de même ordre se produisait à l'égard des germes adven-

tices qui se trouvent mélangés en proportion plus ou moins considérable au vaccin dans les pulpes glycinées.

Cette action des sensibilisateurs sur les microbes est, comme nous l'avons dit, un fait connu de longue date. Il nous a paru intéressant, cependant, d'apporter ici quelques précisions à son sujet, étant donné l'importance que présentent ces germes adventices, en tant que souillures du vaccin. Comme nous l'avons vu, les germes le plus souvent rencontrés sont les staphylocoques blancs, dorés, citreus, subtilis et quelquefois streptocoques. Nos études ont porté sur les plus importants de ces germes, c'est-à-dire sur les staphylocoques.

Nous avons isolé des divers échantillons vaccinaux quelques souches de staphylocoques blancs, dorés et citreus et nous avons comparé sur des émulsions de ces différents microbes l'action de la lumière, d'une part avec et d'autre part sans adjonction des sensibilisateurs. Nous avons utilisé le même dispositif que celui qui nous avait servi pour l'étude de la photosensibilisation du vaccin (page 57). Voici le schéma d'une de nos expériences : à l'aide d'une culture sur gélose de 24 heures, nous avons préparé une émulsion microbienne en eau glycinée renfermant environ 500 à 2.000 germes au centigramme.

Il est facile d'approcher du titre voulu en tenant compte du plus ou moins d'opacité de l'émulsion.

Le taux exact est ensuite fourni par numération sur boîtes de Pétri.

L'émulsion ainsi préparée est partagée en deux parties : l'une d'entre elles est additionnée de sensibilisateur ; toutes deux sont soumises à l'irradiation, côte à côte dans deux godets stérilisés. Les temps d'irradiation varient de

15' à 60'. Parallèlement, deux solutions témoins (avec et sans sensibilisateur) sont conservées à l'obscurité.

Les résultats sont appréciés en ensemençant 0 cc.1 de chaque solution sur boîtes de Pétri et en comptant le nombre de colonies développées au bout de 24 heures.

Les tableaux qui suivent résument quelques-unes de nos recherches. Dans ces tableaux E.O. représente l'émulsion microbienne sans sensibilisateur, E.S. la même émulsion avec le sensibilisateur. Les chiffres expriment le nombre de colonies rapporté à 0 cc.1 d'émulsion microbienne.

Expérience 1.

Staphylocoques blancs, isolés du vaccin XXX.

Richesse de l'émulsion au départ : 4.600 colonies par 0 cm 1.

Durée de l'irradiation : 15 et 60 minutes.

Sensibilisateur : Rose de Bengale à une concentration finale de 1/20.000.

Tableau n° 42

Temps d'irradiation	E.S. Emulsion avec R.B.	E.O. Emulsion sans R.B.
0'	4.600	4.500
15'	2.250	4.500
60'	260	2.200
Témoins conservés à l'obscurité	4.600	4.500

Nous constatons aisément l'importance de l'action sensibilisatrice, s'exerçant sur les microbes : après 15 minutes d'irradiation, la moitié environ des staphylocoques

a disparu dans l'émulsion additionnée de sensibilisateur, alors que la même émulsion sans R.B. et soumise le même temps à l'action des rayons, n'a subi aucune perte en microbes au bout d'une heure d'irradiation ; l'émulsion additionnée de R.B. est à peu près complètement stérilisée (260 germes contre 4.600 au départ), tandis que l'émulsion sans sensibilisateur compte encore près de la moitié de ses germes vivants.

En exprimant la valeur du pouvoir sensibilisateur comme nous l'avons fait précédemment (voir page 60), nous pouvons dire : que la présence de 1/20.000 de R.B. a communiqué à une irradiation par elle-même inopérante un pouvoir destructeur réduisant de 50 % le nombre de microbes de l'émulsion du départ.

Expérience 2.

Staphylocoques blancs isolés du vaccin XXX.

Emulsion du départ : 11.250 col. pour 1 cc.1.

Durée de l'irradiation 15' et 60 minutes.

Sensibilisateur : Rose du Bengale à 1/20.000.

Tableau n° 43

Temps d'irradiation	E.S. Emulsion avec R.B.	E.O. Emulsion sans R.B.
0'	11.250	11.100
15'	200	11.000
60'	0	4.500
Témoins conservés à l'obscurité	11.250	11.100

Le pouvoir sensibilisateur (Ps) a ici pour valeur 40 %.
Au bout de 60 minutes la totalité des germes a été détruite

dans l'émulsion sensibilisée, alors qu'il en reste encore 4.500/11.000, soit 40 %, dans l'émulsion naturelle. C'est donc ce chiffre qui exprime le pouvoir sensibilisateur dans les conditions de l'expérience.

Les autres expériences fournissent des chiffres comparables. Elles montrent, comme les précédentes, que le phénomène de sensibilisation vis-à-vis des germes adventices est d'un ordre de grandeur assez analogue à celle observée vis-à-vis du vaccin.

Influence de la concentration du sensibilisateur

Dans une nouvelle série d'expériences, nous avons fait varier le taux du sensibilisateur et recherché l'influence de la concentration sur l'intensité de la photosensibilisation. Dans ce but, nous avons utilisé deux durées fixes d'irradiation 30' et 50' et déterminé pour chacune d'elles la quantité de microbes disparaissant selon le taux du sensibilisateur utilisé.

Notre dispositif expérimental n'admettant que deux godets côte à côte dans une étroite plage bien uniforme de rayons, nous n'avons pu étudier parallèlement, c'est-à-dire sous la même irradiation, que deux concentrations seulement du sensibilisateur.

Mais en reprenant pour l'expérience suivante l'une de ces concentrations et en la comparant à une nouvelle, il nous a été facile de rétablir la continuité du phénomène.

Expérience 1.

Staphylocoques blancs, isolés du vaccin XXX.

Emulsion de départ : 20.250 par 0 cc.1.

Eosine : 1° à une concentration de 1/10.000
 2° à une concentration de 1/1.000.000
 Temps d'irradiation 10 et 20 minutes.

Tableau n° 44

Temps d'irradiation	Emuls. + Sens. à 1/10.000	Emuls. + Sens. à 1/1.000.000
0'	20.250	18.000
10'	680	6.750
20'	30	880
Témoins conservés à l'obscurité	20.250	18.000

Ce tableau nous montre que la photosensibilisation augmente avec la concentration du sensibilisateur, mais beaucoup moins rapidement que cette concentration.

Au bout de 10 minutes d'irradiation, en effet, la proportion des germes détruits en présence de 1/1.000.000 d'éosine est de $\frac{18.000 - 6.750}{18.000} =$ soit environ 12/20,

alors qu'avec une concentration 100 fois plus forte, c'est-à-dire 1/10.000, elle est de $\frac{20.250 - 680}{20.250} =$ environ 19/20,

soit moins de deux fois plus forte que précédemment.

Le résultat est le même si l'on envisage le temps nécessaire pour obtenir une stérilisation presque complète.

Avec une concentration d'éosine de 1/10.000, il faut 10 minutes environ pour faire passer le nombre de germes de 20.250 à 680. Avec une concentration 100 fois plus faible il suffit de doubler seulement le temps pour obtenir une stérilisation comparable.

Expérience 2.

Staphylocoques blancs, isolés du vaccin XXX.

Emulsion de départ : 15.000 par 0 cc,1.

Eosine : 1° à une concentration de 1/20.000

2° à une concentration de 1/2.000.000

Temps d'irradiation : 30 et 50 minutes.

Tableau n° 45

Temps d'irradiation	Emuls. + Sens. à 1/20.000	Emuls. + Sens. à 1/2.000.000
0'	13.550	15.000
30'	10	1.875
50'	4	400
Témoins conservés à l'obscurité	13.550	15.000

Nous constatons qu'en présence de l'éosine à 1/20.000 la stérilisation est pratiquement complète après 30 minutes d'irradiation. Avec une dose d'éosine 100 fois plus faible (1/2.000.000) en 50', c'est-à-dire sans doubler tout à fait le temps d'irradiation, la stérilisation atteint déjà 97 %. Ici encore, tandis que la concentration du sensibilisateur s'élève de 1 à 100, le pouvoir de photosensibilisation ne passe environ que de 1 à 2.

Il semble donc que les doses faibles de l'ordre de 1/500.000 ou 1/1.000.000 permettent d'obtenir une photosensibilisation d'un ordre peu différent de celui que réalisent les doses élevées à 1/1.000 ou à 1/20.000.

Dans la zone des doses faibles du sensibilisateur à 1/500.000 ou à 1/1.000.000 l'influence de la concentration apparaît plus nette que dans la zone des doses élevées.

Expérience 3

Tableau n° 46

Temps d'irradiation	Emuls. + Sens. à 1/500.000	Emuls. + Sens. à 1/1.000.000
0'	57 col.	44 col.
30'	5	27
50'	0	7
Témoins conservés à l'obscurité	57	44

Expérience 4.

Staphylocoques blancs, isolés du vaccin XXX.

Emulsion de départ : 22.500 col. par 0 cm 1.

Eosine : 1° à une concentration de 1/1.000.000

2° à une concentration de 1/2.000.000

Temps d'irradiation 30 et 50 minutes.

Tableau n° 47

Temps d'irradiation	Emuls. + Sens. à 1/1.000.000	Emuls. + Sens. à 1/2.000.000
0'	22.500	19.350
30'	9.000	15.300
50'	6.750	11.250
Témoins conservés à l'obscurité	22.500	19.350

Dans les deux dernières expériences, la photosensibilisation augmente d'une façon très notable lorsqu'on double seulement la proportion du sensibilisateur.

Nous avons essayé de chercher la concentration limite au-dessous de laquelle cessait de se produire la photosensibilisation à l'égard des microbes de provenance vaccinale.

Avec l'éosine, les concentrations de l'ordre de 1/2.000.000 et voir même de 1/5.000.000 sont encore agissantes. Ce n'est qu'aux environs de la concentration de 1/10.000.000 que le phénomène de photosensibilisation par l'éosine cesse d'être perceptible.

Expérience 5.

Staphylocoques blancs, isolés du vaccin XXX.

Eosine : 1° à une concentration de 1/2.000.000

2° à une concentration de 1/4.000.000

Durée d'irradiation : 30 et 50 minutes.

Tableau n° 48

Temps d'irradiation	Emuls. + Sens. à 1/2.000.000	Emuls. + Sens. à 1/4.000.000
0'	405	390
30'	280	160
Témoins conservés à l'obscurité	390	405

Expérience 6.

Staphylocoques blancs, isolés du vaccin XXX.

Emulsion de départ : 30.000 par 0 cc,1.

Eosine : 1° à une concentration de 1/1.000.000

2° à une concentration de 1/5.000.000

Temps d'irradiation : 30 et 50 minutes.

Tableau n° 49

Temps d'irradiation	Emuls. + Sens. à 1/1.000.000	Emuls. + Sens. à 1/5.000.000
0'	30.000	30.000
30'	900	20.000
50'	807	460
Témoins conservés à l'obscurité	30.000	30.000

Expérience 7.

Staphylocoques blancs, isolés du vaccin XXX.

Emulsion de départ : 30.000 par 0 cc,1.

Eosine : 1° à une concentration de 1/1.000.000

2° à une concentration de 1/10.000.000

Temps d'irradiation 30 et 50 minutes.

Tableau n° 50

Temps d'irradiation	Emuls. + Sens. à 1/1.000.000	Emuls. + Sens. à 1/10.000.000
0'	25.000	27.000
30'	1.000	25.000
50'	130	27.000
Témoins conservés à l'obscurité	30.000	27.000

Photosensibilisation comparative du vaccin et des germes adventices

Les expériences que nous venons de rapporter montrent que certaines substances, telles que l'éosine, le rose de Bengale, exercent une action de photosensibilisation aussi bien vis-à-vis du vaccin que des microbes qui peuvent lui être associés.

Cette action de photosensibilisation s'exerce déjà avec des doses infimes de l'ordre de $1/5.000.000$. Elle augmente avec la concentration suivant une loi compliquée que nous n'avons pas pu déterminer exactement, mais qui semble faire de l'action photosensibilisante un phénomène grossièrement proportionnel au logarithme de la concentration.

Du point de vue pratique il nous a paru intéressant de rechercher si l'irradiation en présence d'un sensibilisateur était susceptible de fournir un procédé de purification du vaccin. Nous avons déjà vu précédemment qu'en l'absence de sensibilisateur l'irradiation d'un vaccin impur amenait la disparition parallèle du virus vaccinal et des microbes adventices, et que, par conséquent, on ne pouvait pas compter sur ce procédé pour purifier du vaccin.

L'expérience que nous rapportons ci-dessous montre, entre plusieurs, que l'adjonction d'un sensibilisateur tel que l'éosine n'améliore pas le procédé. Dans cette expérience, en effet, on voit l'activité du vaccin diminuer au moins aussi rapidement que le nombre des microbes adventices. Au bout de 6 minutes, le vaccin est à peu près complètement détruit, alors qu'il persiste encore 15 % de microbes, qui lui étaient primitivement associés.

Vaccin n° 4 de Lille à 1/1.000.

Lapin noir et blanc ♀ 2 kg 500.

Tableau n° 51

Temps d'irradiation	Vaccin + Sensibilisateur	Microbes + Sensibilisateur
0'	25 pustules	260 col.
3'	3	
6'	1	49
Témoins conservés à l'obscurité	25	260

Mécanisme de la Photosensibilisation

Si la photosensibilisation constitue un phénomène bien démontré, son mécanisme intime reste encore entouré d'incertitude tant au point de vue physique que biologique. Plusieurs théories ont été émises à ce double point de vue.

1° *Photosensibilisation et fluorescence*. — Tappeiner et ses collaborateurs prétendent que la propriété photosensibilisatrice est intimement liée à la fluorescence. Beaucoup de sensibilisateurs sont, en effet, des substances fluorescentes. C'est le cas de l'éosine, de la fluorescéine, du rose Bengale, etc...

Toutefois cette règle, bien qu'habituelle, ne saurait être considérée comme absolue ; c'est ainsi qu'il existe des sensibilisateurs qui paraissent dépourvus de fluorescence visible. Dognon (1) cite à ce point de vue le bleu Poirier, le violet cristallisé, le rouge neutre, etc... D'autre part, il n'y a aucune proportionnalité entre l'intensité du pouvoir photosensibilisant et celle du pouvoir fluorescent.

(1) Dognon. Revue d'Actinologie 1928. Janvier-Mars, p. 14.

C'est ainsi que le rose Bengale est doué d'un grand pouvoir sensibilisant alors que sa fluorescence est peu marquée. Au contraire, la fluorescéine, malgré sa très grande fluorescence, n'exerce qu'une photosensibilisation assez minime.

Certaines substances fluorescentes sont même dépourvues de tout pouvoir sensibilisant.

2° *Photosensibilisation et bande d'absorption.* — On s'est demandé si le phénomène de photosensibilisation portait électivement sur les radiations lumineuses correspondant à la bande d'absorption du sensibilisateur.

Raab (1) constate que la sensibilisation des paramécies, sous l'influence de l'éosine, se manifeste surtout à l'égard de la lumière verte ; et si, comme l'ont fait Tappeiner et Iodlbauer (2), on interpose sur le trajet des rayons lumineux un écran de 2 cm d'éosine à 1/20.000, on supprime par là-même tout effet nocif de la lumière.

Cette relation étroite entre le spectre d'absorption du sensibilisateur et la qualité des rayons pour lesquels joue la photosensibilisation, a été contestée par différents expérimentateurs, en particulier par Wurmser (3) et par Dognon.

Dans des expériences très précises, ce dernier auteur isole au moyen d'écrans spéciaux, dans le rayonnement de la lampe à vapeur de mercure, la double raie jaune (5.790 et 5.760) et la raie verte (5.461). Il mesure l'énergie rela-

(1) Raab. Zeitschr. f. Biol. T. 39 p. 537. 1900 et T. 44 p. 16 1902.

(2) Tappeiner et Iodlbauer. Deutsch. Arch. f. Klin. Mediziu 18 op. 427 1904.

(3) Würmser, Arch. Phys. Biol. T. I, p. 33, 1921 et S. Phys. et Rad. 7.33.1926.

tive de chacune de ces radiations après filtration et les fait agir sur les paramécies en présence du rose de Magdala.

L'expérience lui montre, tout calcul fait, que la sensibilisation est beaucoup plus nette pour la raie jaune, que pour la raie verte. Or, la raie verte, est fortement absorbée par le sensibilisateur utilisé, tandis qu'au contraire la raie jaune tombe en dehors de son spectre d'absorption.

3° *Photosensibilisation et modification du sensibilisateur.* — Une des interprétations qui vient immédiatement à l'esprit dans la discussion du mécanisme de la photosensibilisation est celle qui consiste à supposer que, sous l'influence du rayonnement, le sensibilisateur acquiert des propriétés nocives qu'il ne possédait pas avant l'irradiation.

Il est facile de soumettre à la vérification expérimentale la valeur de cette interprétation. Il suffit pour cela d'irradier dans un premier temps le sensibilisateur, de le placer ensuite au contact d'éléments vivants, et de comparer son action nocive à celle que provoque ce même sensibilisateur non irradié.

Cette expérience schématique a donné en différentes mains des résultats opposés. Dujarric de la Rivière (1), étudiant la photosensibilisation réalisée par le bleu de méthylène à l'égard des meningocoques, a vu le pouvoir antiseptique du bleu de méthylène augmenter sous l'influence de l'irradiation.

D'autres auteurs, opérant avec d'autres substances sensibilisantes, n'ont au contraire obtenu aucune modification du pouvoir antiseptique par les rayons.

(1) Dujarric de la Rivière, Et. Roux et Françoise Cavallier. C.R. de la Soc. de Biol. 1931, t. 106 p. 316 et 799.

Ces résultats différents s'expliquent, sans doute, par les conditions expérimentales spéciales dans lesquelles chaque auteur s'est placé.

Nous rapporterons ici ce que nous avons nous-même obtenu avec l'éosine et le bleu de méthylène sur le virus vaccinal.

L'expérience était réalisée de la façon suivante : 2 cc. d'une dilution de sensibilisateur sont irradiés pendant des durées variables par une lampe à vapeur de mercure à 50 cm. du brûleur. 0 cc,5 du sensibilisateur irradié sont mis en contact pendant 30 minutes avec 0 cc,5 de vaccin à 1/100.

D'autre part, on prépare un mélange témoin de 0 cc,5 du sensibilisateur non irradié avec 0 cc,5 du même vaccin à 1/100.

Un deuxième témoin est constitué par du vaccin à 1/200.

Expérience 1.

Vaccin XXX, à dilution finale à 1/200.

Eosine à dilution finale à 1/1.000.000.

Durée d'irradiation de l'éosine 10', 20' et 30 minutes.

Lapin noir ♂ 2 kg 250.

Tableau n° 52

Dilutions vaccinales	Nombre de pustules sur une plage cutanée
Vaccin sans éosine	150 pustules
Vaccin + éosine	150 »
Vacc. + éosine irr. 10'	150 »
Vacc. + éosine irr. 20'	» »
Vacc. + éosine irr. 30'	» »

Toutes les plages ayant donné une éruption confluyente (150 pustules), nous pouvons conclure que l'irradiation n'a pas communiqué de pouvoir antiseptique à l'éosine.

Expérience 2.

Vaccin XXX : dilution finale à 1/200.

Eosine : dilution finale à 1/1.000.000.

Durée de l'irradiation de l'éosine 5', 20' 40' et 60'.

Lapin gris ♀ 2 kg 350.

Tableau n° 53

Dilutions vaccinales	Nombre de pustules sur une plage cutanée
Vaccin sans éosine	150 pustules
Vaccin + éosine	» »
Vaccin + éosine irr. 5'	» »
Vaccin + éosine irr. 20'	» »
Vaccin + éosine irr. 40'	» »
Vaccin + éosine irr. 60'	» »

Ici encore, malgré des durées plus considérables d'irradiation, on ne note aucune différence entre l'éosine naturelle et l'éosine irradiée.

Expériences 3 et 4.

Vaccin XXX : dilution finale à 1/200.

Eosine : dilution finale à 1/500.000.

Durée de l'irrad. du bleu de méthyl. : 30', 1 h., 1 h. 30 et 2 heures.

Lapin gris ♂ 2 kg 300 (a)

Lapin blanc ♂ 2 kg 250 (b)

Tableau n° 54

Dilutions vaccinales	Nombre de pustules	
	Lapin (a)	Lapin (b)
Vaccin sans éosine	150 pust.	150 pust.
Eosine + vaccin	» »	» »
Eosine irr. 30' + vacc.	» »	» »
Eosine irr. 50' + vacc.	» »	» »
Eosine irr. 60' + vacc.	» »	» »

Aucune différence entre les 6 plages.

Même une irradiation de 2 heures n'a pu augmenter le pouvoir antiseptique de l'éosine.

Le résultat a été le même avec le bleu de méthylène.

Expériences 5 et 6.

Vaccin XXX : dilution finale à 1/200.

Bleu de méthylène : dilution finale à 1/500.000.

Durée d'irradiation : 30', 1 h. 30, 2 h. et 2 h. 30.

Lapin noir ♀ 2 kg 200 (c)

Lapin blanc ♂ 2 kg 370 (d).

Tableau n° 55

Dilutions vaccinales	Nombre de pustules	
	Lapin (c)	Lapin (d)
Vaccin sans éosine	150 pust.	150 pust.
Bleu de méth. + vaccin	» »	» »
Bl. de méth. irr. 30' + vacc.	» »	» »
Bl. de méth. irr. 1 h. 30 + vacc.	» »	» »
Bl. de méth. irr. 2 h. + vacc.	» »	» »
Bl. de méth. irr. 2 h. 30 + vacc.	» »	» »

Les résultats que nous avons obtenus semblent donc

indiquer que l'irradiation d'un sensibilisateur tel que l'éosine ou le bleu de méthylène ne rend pas cette substance secondairement nocive pour le virus vaccinal — autrement dit, dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placée, le phénomène de photosensibilisation ne peut pas être ramené à l'apparition ou à l'augmentation d'un pouvoir antiseptique.

La photosensibilisation apparaît donc comme un phénomène complexe, impliquant l'action des rayons sur le mélange sensibilisateur et sensibilisé.

Un certain nombre d'expériences pratiquées sur les éléments vivants figurés ont établi qu'une substance pouvait sensibiliser sans pénétrer dans l'élément cellulaire. C'est ainsi que les paramécies sont sensibilisées par le rose de Magdala sans qu'on puisse retrouver, même au bout de plusieurs jours, traces de ce colorant dans le protoplasme de ces infusoires. Il faut toutefois, qu'il y ait un contact intime entre le colorant et la surface des éléments vivants ; l'œuf d'*Ascaris*, tant que sa mince membrane reste intacte, échappe à l'action des sensibilisateurs.

Le sensibilisateur, pour agir, doit être absorbé à la surface du protoplasme. Cette action nous permet dans une certaine mesure de comprendre l'intervention de la concentration, l'absorption étant liée à la concentration par une relation logarithmique et les phénomènes de photosensibilisation paraissant suivre une loi très voisine. Si l'absorption du sensibilisateur par le protoplasme cellulaire semble une condition indispensable à la photosensibilisation, il faut reconnaître que, dans certains cas, la liaison sensibilisatrice-protoplasme est particulièrement lâche et immédiatement reversible : comme le fait remar-

quer Dognon, des paramécies, placées dans une solution de rose de Magdala et remises dans l'eau pure (par dilution, par exemple), ne manifestent à l'égard des rayons aucun souvenir de leur séjour préalable dans le sensibilisateur.

Comment s'opère le renforcement de l'action nocive des rayons du fait de la présence d'un sensibilisateur?... La lumière agit-elle *en activant* les molécules du sensibilisateur et celles-ci activent-elles par *induction* les molécules des protoplasmes vivants?... On ne peut à cet égard que formuler des hypothèses.

CHAPITRE IV

ACTION DES RAYONS U. V. SUR LE POUVOIR VIRULICIDE DU SÉRUM ANTIVIRULENT

L'existence d'une propriété antivirulente dans le sérum des vaccinés a été découverte par Béchère, Chambon et Ménard (1). Ces auteurs ont montré, en effet, que le vaccin pouvait être neutralisé in vitro par une quantité convenable de sérum prélevé chez un sujet immunisé, le mélange se trouvant inactif, c'est-à-dire incapable de donner une éruption chez un sujet réceptif.

L'action antivirulente du sérum des vaccinés a été également étudiée par Sternberg (2) qui a donné quelques précisions quantitatives sur l'intensité du pouvoir virulicide.

Depuis lors ce pouvoir a fait l'objet de nombreux travaux de la part de Béchère, Chambon et Ménard, de Lucien Camus (3), de Gastinel (4), de Estéra Ber (5).

- (1) Béchère, Chambon et Ménard. Etudes sur l'immunité vaccinale. 2^e et 3^e Mém. Ann. Inst. Pasteur, 1898, p. 389, 1899 février.
- (2) Sternberg. Wissenschaftliche Untersuchungen über das spezifische Infektionsagens der Blattern und die Erzeugung künstlicher Immunität gegen diese Krankheit. Centralblatt für Bakteriologie, t. XLX, 1896, S 805-857.
- (3) L. Camus. De l'action antivirulente des humeurs des animaux vaccinés. 2^e Mémoire. Journal de phys. et de path. générales, 1909, p. 129.

On sait actuellement que les propriétés virulicides apparaissent vers le 12° ou 15° jour qui suit la vaccination ; elles atteignent rapidement leur intensité maximale et s'atténuent légèrement par la suite, mais persistent encore au bout de quelques années.

On connaît mal la nature de ces substances antivirulentes.

Camus a montré qu'elles résistaient à un chauffage 73° tandis que le pouvoir bactéricide est détruit à 58°.

Nous avons recherché nous-même, comment se comportait ce pouvoir virulicide du sérum, vis-à-vis des radiations ultra-violettes.

Atténuation du pouvoir virulicide par les U.V.

Déjà en 1929, Estera Ber avait montré que 10 minutes d'irradiation à 50 cm. du brûleur d'une forte lampe de quartz ne modifiaient pas le pouvoir virulicide.

Nous avons repris ces expériences en utilisant des durées plus longues et des intensités plus fortes de l'irradiation.

Pour mesurer sur un sérum l'activité restante du pouvoir virulicide, on préparait, conformément au tableau ci-joint, des dilutions croissantes de ce sérum qu'on

Recherches sur la répartition de la substance antivirulente dans l'organisme. Bull. de l'Ac. de Méd. 12 juin 1910.

- (4) Gastinel et Teissier. Des réactions humorales dans la vaccine humaine ou expérimentale et dans la variole ; réactions d'infection et réaction d'immunité. C.R. de l'Acad. des Sc. 1912, p. 1170.
- (5) E. Ber. Quelques recherches sur le pouvoir antivirulent au cours de la vaccine expérimentale chez le lapin.

mélangeait par parties égales avec du vaccin à 1/500. Après une demi-heure de contact, le mélange était éprouvé par l'inoculation au lapin.

Le dosage du pouvoir virulicide était fait comparativement sur le même lapin, d'une part avec le sérum non irradié, et d'autre part avec ce même sérum irradié pendant un certain temps.

Schéma de l'expérience

Tubes	1	2	3	4	5	6	7
Sérum anti- à 1/40 non irradié.	I	II	V	0	0	0	0
Sérum anti- à 1/40 irradié	0	0	0	0	I	II	V
Eau glycinée	IV	III	0	V	IV	III	0
Vaccin XXX à 1/500	V	V	V	V	V	V	V
Concentrat. finale du sérum	1/400	1/200	1/80	0	1/400	1/200	1/80
Concentrat. finale du vaccin	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000

Voici quelques-uns des résultats que nous avons obtenus.

Expérience 1.

Sérum anti dilué 20 fois.

Concentration finale à 1/40.

Irradié pendant 10 minutes.

Distance du brûleur : 40 cm.

Vaccin XXX : dilution finale à 1/1000.

Inoculation d'épreuve pratiquée sur le lapin gris 2 kg
450.

Tableau n° 56

	Témoin : vaccin sans sérum	Sérum anti non irradié			Sérum anti irradié		
Concentrat. finale							
du vaccin	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000
Concentrat. finale							
du sérum	0	1/400	1/200	1/80	1/400	1/200	1/80
Nombre de pustules	24	15	12	2	21	17	13

On voit que le nombre de pustules est plus grand pour le sérum irradié, ce qui revient à dire que le pouvoir virulicide a faibli sous l'influence de l'irradiation.

Expérience 2.

Sérum anti. dilué 20 fois.

Concentration finale à 1/40.

Durée de l'irradiation : 20 minutes.

Distance du brûleur : 40 cm.

Vaccin XXX, dilution finale à 1/1000.

Inoculation d'épreuve pratiquée sur un lapin roux ♂ de 2 kg 375.

Tableau n° 57

	Témoin : vaccin sans sérum	Sérum anti non irradié			Sérum anti irradié		
Concentrat. finale							
du vaccin	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000
Concentrat. finale							
du sérum	0	1/400	1/200	1/80	1/400	1/200	1/80
Nombre de pustules	22	8	10	1	26	21	14

Cette expérience confirme la précédente. L'atténuation du pouvoir virulicide a légèrement augmenté avec la durée de l'irradiation.

Expérience 3.

Sérum anti. dilué 20 fois.

Concentration finale : 1/40.

Durée de l'irradiation : 40 minutes.

Distance du brûleur : 40 centimètres.

Vaccin XXX, dilution finale à 1/1000.

Lapin noir ♂ 2 kg 700.

Tableau n° 58

	Témoin :	Sérum anti				Sérum anti		
	vaccin sans sérum	non irradié				irradié		
Concentrat. finale								
du vaccin	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000
Concentrat. finale								
du sérum	0	1/400	1/200	1/80	1/400	1/200	1/80	
Nombre de pustules	14	5	8	4	10	11	9	

Expérience 4.

Sérum anti. dilué 20 fois.

Concentration finale : 1/40.

Durée de l'irradiation : 40 minutes.

Distance du brûleur : 40 centimètres.

Vaccin XXX, dilution finale à 1/1000.

Lapin gris 2 kg 100.

Tableau n° 59

	Témoin :	Sérum anti				Sérum anti		
	vaccin sans sérum	non irradié				irradié		
Concentrat. finale								
du vaccin	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000
Concentrat. finale								
du sérum	0	1/400	1/200	1/80	1/400	1/200	1/80	
Nombre de pustules	30	34	4	1	30	29	24	

Avec une irradiation de 40 minutes, le pouvoir virulicide est presque complètement détruit.

Dans une autre série d'expériences nous avons essayé d'établir la courbe d'affaiblissement du sérum virulicide en fonction de l'irradiation.

Dans ce but, nous avons préparé une dilution à 1/20 de sérum irradié que nous avons soumis au rayonnement d'une forte lampe à vapeur de mercure (5 amp. 300 w.) à 40 cm du brûleur. Au bout de 20', 40', 60', 80', 120 minutes on prélevait un échantillon de la dilution qu'on mélangeait à son volume de vaccin à 1/500.

Au bout de 1/2 heure de contact à la température du laboratoire, 0,2 cc de chacun de ces mélanges étaient inoculés sur un même lapin.

Expérience 1.

Sérum anti. dilué 20 fois.

Concentration finale à 1/40.

Durée de l'irradiation : 20', 40', 60' et 80 minutes.

Distance du brûleur : 40 cm.

Vaccin M. n° 179, concentration finale à 1/1000.

Lapin gris ♂ 2 kg 400.

Tableau n° 60

Concentration finale du vaccin	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000
Concentration finale du sérum	1/40	1/40	1/40	1/40	1/40	0
Durée de l'irr. du sérum anti.	0'	20'	40'	60'	80'	—
Nombre de pustules	7	14	30	27	28	58

Au bout de 40 minutes le sérum anti. qui, primitivement, empêchait le développement de 51 pustules sur 58, c'est-à-dire montrait un pouvoir virulicide de 88 %, ne présentant plus qu'un pouvoir virulicide de 52 %, soit une perte de 40 % sur son activité première.

Le pouvoir virulicide se maintient ensuite sans changement entre la 40^e et la 80^e minute.

Expérience 2.

Sérum anti-dilué 20 fois.

Concentration finale à 1/40.

Durée de l'irradiation : 20', 40', 60' et 80 minutes.

Distance du brûleur : 40 cm.

Vaccin M. n° 197 : concentration à 1/1000.

Lapin gris 2 kg 220.

Tableau n° 61

Concentration finale du vaccin	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000
Concentration finale du sérum anti.	1/40	1/40	1/40	1/40	1/40	0
Durée de l'irr. du sérum anti.	0'	20'	40'	60'	80'	—
Nombre de pustules	12	15	24	20	41	80

Dans cette expérience, le pouvoir virulicide primitivement de 85 % (c'est-à-dire empêchant le développement de 85 % de pustules) tombe à 80 % au bout de 20 minutes et à 50 % au bout de 80 minutes.

Expérience 3.

Sérum anti. dilué 20 fois.

Concentration finale à 1/40.

Durée de l'irradiation : 30', 1 h. et 2 heures.

Distance du brûleur : 40 cm.

Vaccin XXXI, concentration à 1/20.000.

Lapin gris ♀ 2 kg 530.

Tableau n° 62

Concentrat. finale					
du vaccin	1/20.000	1/20.000	1/20.000	1/20.000	1/20.000
Concentration du					
sérum anti.	1/40	1/40	1/40	1/40	0
Durée de l'irr.					
du sérum anti.	0'	30'	60'	120'	—
Nombre de pust.	9	21	52	90	89

Le pouvoir virulicide de 90 % au départ, tombe à 78 % au bout d'une demi-heure ; à 42 % au bout d'une heure, et s'annule complètement au bout de 2 heures d'irradiation.

Les expériences que nous venons de rapporter montrent qu'une irradiation intense et prolongée par les U.V. peut amener la disparition complète du pouvoir virulicide. On pouvait se demander si cette inactivation de sérum anti ne tenait pas purement et simplement à son échauffement du fait même de l'irradiation.

Les expériences déjà citées de L. Camus, montrant la thermostabilité des propriétés virulicides du sérum, rendaient cette hypothèse peu vraisemblable. Afin d'éliminer complètement l'intervention d'un échauffement qui, quoique peu marqué, pouvait agir cependant pendant la longue durée de l'expérience, nous avons mesuré la température que prenait notre dilution du sérum en cours d'irradiation. Cette température n'a pas dépassé 33°. Dans une expé-

rience témoin, nous avons fait agir cette température *seule*, indépendamment de toute irradiation, pendant un temps équivalent et étudié son influence sur les propriétés virulicides du sérum sanguin.

Comme le montre le tableau ci-joint, cette action de la température seule s'est révélée totalement inopérante.

Expérience 4.

Sérum anti. dilué 20 fois.

Concentration finale à 1/20.000.

1° chauffé 2 heures à 38°

2° soumis pendant 2 heures à l'irradiation.

Distance du brûleur : 40 cm.

Vaccin XXXI, concentration finale à 1/20.000.

Inoculation d'épreuve sur un lapin gris ♀ 2 kg 800.

Tableau n° 63

Concentrat. finale				
du vaccin	1/20.000	1/20.000	1/20.000	1/20.000
Durée de l'irrad.				
du sérum anti.	0	1/40	1/40	1/40
Température	19°	33°	33°	19°
Nombre de pust.	50	52	8	6

On voit, en effet, que le pouvoir virulicide en est le même pour le sérum maintenu 2 heures à 33° que pour le sérum conservé le même temps à la température du laboratoire (88 % dans le premier cas, 84 % dans le second). Par contre, le sérum irradié pendant 2 heures a perdu toute propriété antivirulente.

Ce sont donc bien les rayons chimiques et non les rayons thermiques qui suppriment le pouvoir virulicide.

Ce pouvoir est toutefois beaucoup moins sensible aux rayons de courtes longueurs d'ondes que ne l'est le vaccin. La différence ressort des chiffres que nous avons donnés, d'une part pour le vaccin, d'autre part pour le sérum antivirulent.

Elle apparaît nettement dans l'expérience suivante où nous avons soumis pendant quelques minutes à l'action d'une forte lampe à vapeur de mercure, simultanément, d'une part du sérum anti. et d'autre part du vaccin. Au bout de 10 minutes, celui-ci est complètement stérilisé alors que les propriétés virulicides du sérum ne sont encore qu'à peine touchées.

Expérience 5.

Sérum anti. dilué 20 fois.	}	Irradiation : 10 minutes.
Concentration finale : 1/40.		
Vaccin L. Ch. n° 894.		
Concentr. finale : 1/200.		
Lapin blanc ♀ 2 kg 200.		

Tableau n° 64

	Témoin	Vaccin	Sér. anti irr. 10'	Sér. anti non irr.
	vaccin	irr. 10'	+ vaccin	+ vaccin
Nombre de pustules	64	0	6	0

CONCLUSIONS

1° — Les rayons ultra-violetes ont une action abiotique très puissante sur le virus vaccinal. Une dilution de vaccin au 1/100 est détruite en quelques minutes à 50 cm du brûleur par les rayonnements d'une lampe à vapeur de mercure dite de 300 w.

Avec un rayonnement moins actif on peut suivre les différentes phases de la destruction du vaccin. Il existe un seuil pour l'action abiotique. Ce seuil franchi, la virulence du vaccin décroît d'abord très rapidement et ensuite plus lentement, certains éléments du vaccin, particulièrement résistants, nécessitant une irradiation assez longue pour disparaître.

2° — Les microbes adventices de la pulpe vaccinale offrent à l'égard des U.V. une résistance du même ordre de grandeur que celle du vaccin.

Parmi les staphylocoques qui représentent les germes les plus fréquemment associés au vaccin, le staphylocoque citreus est le moins sensible à l'action des rayons.

3° — Les repiquages de colonies provenant de l'émulsion du staphylocoque citreus ayant subi une irradiation non complètement stérilisante, nous ont donné des germes plus sensibles aux rayons que le témoin, provenant d'une émulsion non irradiée.

4° — Du point de vue pratique, étant donné la sensi-

bilité à peu près équivalente du virus vaccinal et des germes adventices, on ne peut pas fonder sur l'irradiation par les rayons U.V. une méthode simple de purification du vaccin.

5° — Le vaccin subit de la part de certaines substances, telles que l'éosine, le Rose Bengale, le phénomène de photosensibilisation. L'adjonction à une dilution vaccinale à 1/1000, à 1/500.000 et à 1/1.000.000 d'éosine diminue dans la proportion de 10 à 1 le temps nécessaire pour obtenir la stérilisation complète par les U.V.

6° — Les germes adventices obéissent de la même façon à la photosensibilisation et l'emploi d'un sensibilisateur ne nous a pas permis d'obtenir par l'irradiation de courte longueur d'onde une purification du vaccin.

7° — L'irradiation séparée d'une solution d'éosine ou de bleu de méthylène ne confère pas à ces substances un pouvoir antiseptique vis-à-vis du vaccin pouvant expliquer leur action photosensibilisatrice.

8° — Les substances virulicides, contenues dans le sérum des lapins vaccinés sont beaucoup plus résistantes que le vaccin à l'action des rayons U.V. Une irradiation prolongée amène, cependant, la destruction en un temps environ 20 fois supérieur à celui nécessaire à la stérilisation du vaccin.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Les réactions d'immunité dans la série animale.

Vu et approuvé.

Paris, le 29 octobre 1932.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

C. MAURAIN.

Vu et permis d'imprimer.

Le Recteur de l'Académie de Paris :

CHARLÉTY.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	13
CHAPITRE I. — <i>Considérations techniques</i>	15
CHAPITRE II. — <i>Action abiotique des U.V. sur le vaccin</i> <i>et ses germes</i>	21
Rayons U.V. et vaccin	23
Rayons U.V. et microbes isolés du vaccin	37
Résistance comparative du virus vaccinal et des germes adventices	50
CHAPITRE III. — <i>Photosensibilisation du vaccin et des</i> <i>germes adventices</i>	55
Photosensibilisation du vaccin	58
Photosensibilisation des germes adventices	69
Photosensibilisation comparative du vaccin et des germes adventices	79
Mécanisme de la Photosensibilisation	80
CHAPITRE IV. — <i>Action des U.V. sur le pouvoir viru-</i> <i>licide du sérum de vacciné</i>	88
Courbe d'atténuation	89
Parallèle entre l'action des U.V. sur le virus vaccinal et les substances virulicides	97
CONCLUSIONS	99

IMPRIMERIE LES PRESSES MODERNES
45, rue de Maubeuge, Paris
(Ateliers de Reims — Marne)

